

Dissertation

**Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation der  
Phospholipase A/Lysophospholipase A (PlaB) von  
*Legionella pneumophila***

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl. Biol. Eva Schunder,

21.04.78, Kassel

Präsident: der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:   1. PD. Dr. Klaus Heuner  
                  2. Prof. Dr. Erwin Schneider  
                  3. PD. Dr. Antje Flieger

Datum der mündlichen Prüfung:   10.12.2009

Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1 Der Genus <i>Legionella</i> .....	5
1.2 Biologie und natürliche Habitate von <i>Legionella</i> .....	5
1.3 Der Lebenszyklus von <i>Legionella</i> .....	6
1.3.1 Die <i>Legionella</i> MIF-Form .....	9
1.4 Epidemiologie von <i>L. pneumophila</i> .....	9
1.5 Legionellose: Pontiac Fieber und Legionärskrankheit .....	11
1.6 Diagnostik und Therapie .....	11
1.7 Der Atmungsapparat .....	13
1.7.1 Der Lungensurfactant .....	14
1.8 Histologie der Legionärskrankheit im Meerschweinchenmodell .....	15
1.9 Proteinsekretionssysteme und Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i> .....	16
1.9.1 Proteinsekretionssysteme .....	16
1.9.1.1 Translokation über die innere Membran .....	17
1.9.1.2 Das putative Typ I Sekretionssystem .....	17
1.9.1.3 Typ II Sekretion .....	18
1.9.1.4 Typ III Sekretion .....	18
1.9.1.5 Typ IV Sekretion .....	19
1.9.1.6 Das putative Typ V Autotransportersystem .....	20
1.9.1.7 Typ VI Sekretion .....	20
1.9.2 Virulenzfaktoren .....	20
1.9.2.1 Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von <i>Legionella</i> .....	20
1.9.2.2 Sekretierte Virulenzfaktoren von <i>Legionella</i> .....	21
1.10 Klassifizierung von Lipasen und Phospholipasen .....	22
1.10.1 Klassifikation von Lipasen nach Substratspezifität und der Hydrolyseposition .....	22
1.10.2 Klassifikation von Lipasen nach ihrer Aminosäuresequenzhomologie .....	23
1.11 Phospholipasen als Pathogenitätsfaktoren .....	24
1.11.1 Phospholipasen in <i>Legionella</i> .....	26
1.11.1.1 Das PlaB-Protein .....	27
1.12 Genregulation von hydrolytischen Enzymen in <i>L. pneumophila</i> .....	28
1.13 Ziele der Arbeit .....	29
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.1 Material .....	30
2.1.1 Bakterienstämme .....	30
2.1.2 Infektionsmodelle .....	32
2.1.3 Vektoren .....	32

2.1.3.1	Vektorkarte pCAL-n .....	33
2.1.3.2	Vektorkarte pCAL-c .....	33
2.1.3.3	Vektorkarte pBCKS+ .....	34
2.1.3.4	Vektorkarte pGEMTeasy .....	34
2.1.4	Rekombinante Plasmide .....	35
2.1.5	Oligonukleotide .....	36
2.1.6	Chemikalien .....	37
2.1.7	DNA- und Proteingrößenstandards .....	37
2.1.7.1	DNA-Größenstandards .....	37
2.1.7.2	Protein-Größenstandards .....	38
2.1.8	Antibiotika und Medienzusätze .....	38
2.1.9	Antikörper .....	39
2.1.10	Enzyme .....	40
2.1.11	Verwendete Kits .....	40
2.1.12	Geräte .....	41
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.2.1	Kultivierungstechniken .....	42
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	42
2.2.1.2	Kultivierung von <i>Legionella</i> .....	43
2.2.1.3	Kultivierung von <i>A. castellanii</i> .....	44
2.2.1.4	Konservierung von Bakterien .....	45
2.2.2	Nukleinsäure-Techniken .....	45
2.2.2.1	Isolation von Gesamt-RNA .....	45
2.2.2.2	Isolation von chromosomaler DNA .....	45
2.2.2.3	Isolation von Plasmid-DNA .....	46
2.2.2.4	Phenol-Chloroform Extraktion .....	47
2.2.2.5	DNA Fällung .....	47
2.2.2.6	Restriktionsverdau .....	48
2.2.2.7	<i>DpnI</i> Verdau .....	48
2.2.2.8	Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA .....	49
2.2.2.9	Klenow-Reaktion .....	49
2.2.2.10	Religation .....	50
2.2.2.11	Ligation von DNA mit dem pGEMTeasy Ligationskit .....	50
2.2.2.12	Ligation von DNA mit T4 Ligase .....	51
2.2.2.13	Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	52
2.2.2.14	Transformation durch Elektroporation .....	52
2.2.2.15	Natürliche Transformation von <i>Legionella</i> .....	53
2.2.2.16	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	53
2.2.2.17	Inverse PCR .....	55
2.2.2.18	PCR mit ganzen Bakterien („Aufkoch-PCR“) .....	56
2.2.2.19	Sequenzierungs-PCR .....	56
2.2.2.20	Reverse Transcription (RT)-PCR .....	57
2.2.2.21	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	58
2.2.2.22	Gelelution von DNA-Fragmenten durch Kälte-Phenol-Extraktion .....	58
2.2.2.23	Bestimmung des Transkriptionsstarts von <i>plaB</i> (RACE Methode) .....	59
2.2.2.24	Herstellung der LpC <i>plaB</i> ::Km knock-out Mutante .....	60
2.2.3	Proteinchemische Methoden .....	61
2.2.3.1	Überexpression von PlaB mit CBP-„tag“ .....	61
2.2.3.2	Aufreinigung von PlaB über Calmodulinsäulen .....	61
2.2.3.3	Detektion von CBP-PlaB über den „tag“ .....	63
2.2.3.4	Präadsorption von Antikörpern .....	64
2.2.3.5	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	64
2.2.3.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	66
2.2.3.7	Western Blot („semi-dry“ Verfahren) .....	67
2.2.3.8	„Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen .....	68
2.2.3.9	Anreicherungsfraktionierung .....	69
2.2.3.10	Sucrosedichtegradientenfraktionierung .....	69
2.2.3.11	Proteinase K Verdau .....	70
2.2.4	Phänotypische Assays .....	71
2.2.4.1	Probengewinnung für wachstumsphasenspezifische Untersuchungen .....	71
2.2.4.2	Phospholipase Aktivitätsassay (PLA-Assay) .....	71

2.2.4.3	Flüssighämolyseassay .....	73
2.2.4.4	Hämolyseassay auf Humanblut-Platten .....	73
2.2.4.5	Salz-Streßtest .....	74
2.2.4.6	Proteaseaktivität.....	74
2.2.5	<i>In vivo</i> Experimente.....	75
2.2.5.1	Infektion von <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	75
2.2.5.2	Infektion von Meerschweinchen.....	76
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1</b>	<b>Analysen zur Expression und Aktivität von PlaB .....</b>	<b>78</b>
3.1.1	<i>In silico</i> Analysen.....	78
3.1.2	Bestimmung des Transkriptionsstarts.....	81
3.1.3	Wachstumsphasen-spezifische Expression.....	83
3.1.3.1	Genexpression in unterschiedlichen Wachstumsphasen .....	83
3.1.3.2	Enzymatische Aktivität in unterschiedlichen Wachstumsphasen .....	84
<b>3.2</b>	<b>Studien zur Lokalisation von PlaB .....</b>	<b>86</b>
3.2.1	Herstellung einer <i>plaB</i> knock-out Mutante in <i>L. pneumophila</i> Corby.....	86
3.2.2	Polyklonale Antikörper gegen das PlaB-Protein .....	90
3.2.2.1	Antikörper gegen ein synthetisch hergestelltes PlaB-15-mer .....	90
3.2.2.2	Antikörper gegen überexprimiertes und aufgereinigtes PlaB .....	91
3.2.3	„Einfache“ Fraktionierung zur membranständigen Lokalisation .....	96
3.2.4	Membranfraktionierung durch Sucrosedichtegradientenzentrifugation .....	97
3.2.5	Proteinase K-Verdau .....	99
3.2.6	Export von PlaB .....	100
<b>3.3</b>	<b>Virulenzassoziation von PlaB.....</b>	<b>102</b>
3.3.1	Salz-Stresstest.....	102
3.3.2	Verbreitung von PlaB.....	103
3.3.3	Infektion von <i>A. castellanii</i> .....	105
3.3.4	Virulenz im Meerschweinchenmodell.....	106
3.3.4.1	Untersuchung der Replikation in der Lunge und Infektion der Milz .....	106
3.3.4.2	Histologie der Lunge .....	107
3.3.5	Rolle der <i>Legionella</i> -Virulenzfaktoren Flagellin, Msp und Mip.....	111
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>114</b>
<b>4.1</b>	<b>Transkriptionsrate und enzymatische Aktivität von PlaB .....</b>	<b>114</b>
4.1.1	<i>In silico</i> Analysen.....	114
4.1.2	Bestimmung des Transkriptionsstarts.....	117
4.1.3	Wachstumsphasen-spezifische Expression.....	119
<b>4.2</b>	<b>Enzymatisch aktives PlaB ist mit der äußeren Membran assoziiert.....</b>	<b>121</b>
4.2.1	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	121
4.2.2	Enzymatisch aktives PlaB ist ein Protein der äußeren Membran .....	123
4.2.3	Export des PlaB-Proteins.....	125
<b>4.3</b>	<b>PlaB ist ein Virulenzfaktor.....</b>	<b>126</b>
4.3.1	<i>In vitro</i> -Studien zur Virulenzassoziation von PlaB .....	126
4.3.2	Infektion von <i>A. castellanii</i> .....	128
4.3.3	Virulenz im Meerschweinchenmodell.....	129
4.3.4	Rolle der <i>Legionella</i> -Virulenzfaktoren Flagellin, Msp und Mip.....	131
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>133</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>135</b>



<b>ANHANG.....</b>	<b>156</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>164</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>167</b>
<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>170</b>

## Zusammenfassung

*Legionella pneumophila* ist ein humanpathogenes Gram-negatives Bakterium, das durch das Einatmen kontaminierter Aerosole in die Lunge gelangen kann. Dort vermehrt es sich in den Alveolarmakrophagen, kann sich in der Lunge ausbreiten und so zu einer schweren Pneumonie, der Legionärskrankheit, führen. Die molekularbiologischen Mechanismen, die *Legionella* zur Ausprägung dieser Pneumonie befähigen, sind bisher nur zum Teil bekannt.

Phospholipasen können zur Pathogenität von Bakterien beitragen, indem sie den Wirt durch Zerstörung der Lipidstrukturen schädigen, oder über die Generation von „second messengern“ immunmodulatorisch wirken. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass *Legionella*-Phospholipasen sowohl Membranen als auch den für die Lungenfunktion essentiellen Surfactant zerstören können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die kürzlich identifizierte prominenteste zell-assoziierte und hämolytische Phospholipase A/Lysophospholipase A (PlaB) von *L. pneumophila* Corby charakterisiert und auf eine mögliche Virulenzassoziation hin untersucht werden.

PlaB ist ein hochkonserviertes Protein, welches mit der Ausnahme von *Legionella micdadei* in allen bisher sequenzierten *L. pneumophila* und non-*pneumophila* Stämmen und allen weiteren in dieser Arbeit untersuchten *Legionella*-Isolaten vorliegt.

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *plaB* ermöglichte die Analyse der *plaB*-Promotorregion und die Identifikation einer möglichen  $\sigma^{70}$ -Bindungsstelle. Die Transkriptionsrate von *plaB* ist relativ gering und steht im Gegensatz zu einer sehr starken enzymatischen Aktivität. Die Genexpression nimmt von der exponentiellen zu stationären Phase hin ab, wobei auch die hämolytische und die Phospholipase A-Aktivität vorwiegend bis zum Ende der exponentiellen Phase auftreten.

Lokalisationsstudien zeigten zunächst eine Assoziation des PlaB-Proteins mit der Membranfraktion von *L. pneumophila*. Daraufhin wurden die Membranen durch Sucroседichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt. Da die Immunisierung von Kaninchen mit synthetisch hergestellten PlaB-Peptiden und aufgereinigtem PlaB-Protein nicht zu einem polyklonalen Antikörpern geführt hatte, mit dem PlaB in wildtypischen Legionellen detektiert werden konnte, wurde die Lokalisierung des PlaB-Proteins über seine enzymatische Aktivität durchgeführt. Enzymatisch aktives PlaB-Protein ist in/an der äußeren Membran von *L. pneumophila* Corby lokalisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit generierte *L. pneumophila* *plaB*::Km knock-out Mutante wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte in keiner Fraktion des Sucrosegredienten hämolytische oder Phospholipase A-Aktivität. Durch die

Inkubation ganzer Bakterien mit Proteinase K ließ sich zudem zeigen, dass zumindest Teile des PlaB-Proteins auf der oberflächenexponierten Seite der äußeren Membran liegen. Studien mit Sekretionsmutanten zeigten, dass der Transport des PlaB-Proteins nicht vom Tat-abhängigen Transport oder den Sekretionssystemen des Typ I, II oder IVB abhängig ist.

Der biphasische Lebenszyklus von *Legionella* ist durch Salzresistenz in der replikativen Phase und Salzsensitivität in der transmissiven Phase gekennzeichnet. Einige avirulente Mutanten zeigen auch in der transmissiven Phase einen salzresistenten Phänotyp. *PlaB*-defiziente Legionellen sind in der transmissiven Phase salzsensitiv.

In *Acanthamoeba castellanii*, einem natürlichen Wirt von *Legionella*, zeigten *plaB*-Mutanten keinen Replikationsdefekt. Die Infektion von Meerschweinchen mit wildtypischen und *plaB*-defizienten Legionellen zeigte dagegen, dass PlaB eine wichtige Rolle für die Pathogenität der Bakterien spielt. PlaB-defiziente Bakterien zeigten in Meerschweinchenlungen eine geringere Replikationsrate und konnten nur zu einem sehr geringen Teil in die Milz der Tiere vordringen. Die histopathologische Untersuchung der Lungen bestätigte die geringere Anzahl der *plaB*-defizienten Bakterien. Während die mit wildtypischen Legionellen infizierten Lungen eine konfluente Bronchopneumonie zeigten, war die Entzündungsreaktion nach Infektion mit der *plaB*-Mutante hauptsächlich auf Bereiche um die Bronchiolen beschränkt. Weiterhin wurde nach der Infektion mit wildtypischen Legionellen eine sehr viel stärkere Endotheldestruktion festgestellt als nach Infektion mit *plaB*-defizienten Legionellen.

Die beobachtete Virulenzattenuation im Meerschweinchen ist nicht auf die *in vivo* Virulenzfaktoren Msp-Protease (codiert durch *proA*) oder „macrophage infectivity potentiator“ (Mip) zurückzuführen. Nicht flagellierte *Legionella*-Mutanten besitzen aktives PlaB-Protein auf ihrer Oberfläche. PlaB wird nicht durch die Msp-Protease oder Mip aktiviert.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei der hämolytischen PLA/LPLA PlaB um ein innerhalb der Spezies *Legionella* sehr weit verbreitetes Protein handelt, welches in *L. pneumophila* Corby vorwiegend vor dem Eintritt in die stationäre Phase exprimiert wird und enzymatisch aktiv ist. Enzymatisch aktives PlaB-Protein ist an der oberflächenexponierten Seite der äußeren Membran zu finden und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Legionellen-Pneumonie.

Schlagwörter: *Legionella*, Phospholipase A, PlaB, Virulenz, Hämolysen, Meerschweinchen, Äußere Membran

## Summary

*Legionella pneumophila* is a Gram-negative pathogenic bacterium, which reaches the human lung via inhaled contaminated aerosols. *Legionella* replicates inside of alveolar macrophages, colonizes the lungs and causes a severe pneumonia, the Legionnaires' disease. The bacterial mechanisms contributing to the establishment of the disease are not fully understood in detail. Bacterial phospholipases are well known virulence factors. Some cause cell lysis by pore formation, others generate second messengers and modulate the inflammatory response of the host. *In vitro* studies confirmed the potential of *Legionella* phospholipases to destroy membranes and lung surfactant.

The aim of this work was to further characterize the recently identified major cell-associated hemolytic phospholipase A/lysophospholipase A activity (PlaB) of *L. pneumophila* Corby and to investigate a possible role of PlaB as virulence factor.

PlaB is a highly conserved protein, which was detected in all sequenced and studied *L. pneumophila* and non-*pneumophila* strains except *Legionella micdadei*. Determination of the transcriptional start site of *plaB* allows analysis of the *plaB*-promoter region and identification of a possible  $\sigma^{70}$ -binding site. The transcription rate is relatively weak and in contrast to the prominent enzymatic activity of *plaB*. Gene expression decreases from exponential to stationary phase and hemolytic and PLA activity is most prominent in the exponential growth phases.

Localisation studies revealed an association of the PlaB-protein with the *L. pneumophila* membranes. Subsequently, the membranes were fractionated by sucrose gradient density centrifugation. Because the immunisation with synthetically produced PlaB-peptides or with purified PlaB-protein did not yield a sufficient polyclonal PlaB-detecting antibody, the PlaB-protein was detected by its hemolytic and PLA activity. Enzymatically active PlaB-protein is localised in the outer membrane of *L. pneumophila* Corby. A generated *L. pneumophila* Corby *plaB::Km* knock-out mutant served as control and showed no enzymatic activity in any of the sucrose gradient fractions. Additionally, incubation of whole cell-bacteria with proteinase K revealed a surface-exposed localisation of at least parts of the PlaB-protein. Studies with mutants of the Tat-dependent pathway and the type I, II, IVB secretion systems showed that these pathways are not involved in secretion of the PlaB-protein.

A characteristic feature of the biphasic life cycle from *Legionella* is salt resistance in the replicative phase and salt sensitivity in the transmissive phase. Some avirulent mutants lack

the salt sensitive phenotype. *PlaB*-deficient *Legionella*-mutants were salt sensitive in the transmissive phase.

*PlaB*-deficient mutants did not express a replication defect in the natural host *Acanthamoeba castellanii*. Nevertheless, infection of guinea pigs revealed that PlaB plays an important role in proliferation of the bacteria in the lungs and dissemination to the spleen. Histopathological determination of the lungs confirmed the lower amount of *plaB*-deficient bacteria. Furthermore, lungs of animals infected with *Legionella* wild-type developed a confluent bronchopneumonia whereas inflammation of lungs infected with the *plaB*-mutant was restricted to patchy bronchioli surrounding areas. Moreover, after infection with *Legionella* wild-type lung endothelial structures were much more destructed.

The observed virulence attenuated phenotype in guinea pig infection model is not linked to Msp-protease (encoded by *proA*) or macrophage infectivity potentiator (Mip). Non-flagellated *Legionella*-mutants express active PlaB-protein on the surface. PlaB is not activated by Mip or Msp.

In summary, this work revealed that the major cell-associated hemolytic and PLA/LPLA PlaB-protein is a widespread protein. In *L. pneumophila* Corby, it is primarily expressed and active before stationary phase. Enzymatically active PlaB-protein is at least in parts located at the surface-exposed side of the outer membrane and contributes to the establishment of Legionnaires' disease.

Keywords: *Legionella*, phospholipase A, virulence, hemolysis, guinea pig, outer membrane

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Genus *Legionella*

Der Genus *Legionella* in der Familie der *Legionellaceae* gehört zu den  $\gamma$ - Proteobakterien (Benson und Fields, 1998). Zurzeit sind 56 Spezies mit mindestens 73 Serogruppen bekannt (www.dsmz.de; www.bacterio.cict.fr/). Allerdings werden 75% der *Legionella* Infektionen von *L. pneumophila* der Serogruppe 1 hervorgerufen. Für 20-30% sind andere Serogruppen die Ursache und 5-10% der Infektionen entstehen durch andere *Legionella* Spezies (Lück, 2008).

Humanisolate von *Legionella* werden als hochvirulent eingestuft. Ein solcher Stamm ist der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Stamm *L. pneumophila* Corby, dessen Genom vor kurzem komplett sequenziert wurde (Glöckner et al., 2008).

Neben den klassischen Vertretern der Gattung *Legionella* sind zwölf sogenannte „*Legionella*-like-amoebal pathogens“ (LLAP) bekannt. Sie wurden aus Patientenmaterial oder Umweltproben isoliert und in Ko-Kultur mit Protozoen angezüchtet (Adeleke et al., 2001; Adeleke et al., 1996; Drozanski, 1956; La Scola et al., 2004; Newsome et al., 1998).

Bei geringem Nährstoffangebot können Legionellen in ein „viable but non culturable“ (VBNC) Stadium übergehen. Dieser Mechanismus erleichtert das Überleben außerhalb von Protozoen (Steinert et al., 1997) (siehe 1.2 und 1.3).

## 1.2 Biologie und natürliche Habitate von *Legionella*

Legionellen sind Gram-negative, aerobe, flagellierte Stäbchen mit einer Länge von 2-20  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  (Blackmon et al., 1981). Bei Temperaturen von 25-42°C können sie sich vermehren, allerdings liegt das Temperaturoptimum bei 35°C (Katz und Hammel, 1987). Als Energie- und Kohlenstoffquelle dienen Aminosäuren (George et al., 1980).

Legionellen werden als Umweltkeime bezeichnet, da sie in 80% der Frischwasserhabitate freilebend, biofilm-assoziiert oder in bestimmten Protozoen zu finden sind. Dazu gehören *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Echinamoeba*, *Naegleria* und *Tetrahymena* (Fields, 1996; Fields et al., 2002; Rowbotham, 1986). Die intrazelluläre Vermehrung bietet den Vorteil, dass

die Bakterien hier die erforderlichen Nährstoffe vorfinden und vor äußeren Einflüssen geschützt sind (Fields, 1996; Fliermans et al., 1981; Rowbotham, 1980). Weiterhin können die Bakterien den Wirt zu ihrem Nutzen manipulieren. Wenn Legionellen-haltige Aerosole in die Lunge gelangen, können die Bakterien die für die Kolonisierung der Protozoen erworbenen Mechanismen nutzen und in den Alveolarmakrophagen replizieren (siehe 1.3).

### 1.3 Der Lebenszyklus von *Legionella*

Da *Legionella* die für die Replikation in Amöben erworbenen Mechanismen auch zur Vermehrung in Alveolarmakrophagen nutzt, ist der Lebenszyklus in beiden Wirtszellen sehr ähnlich. Er unterteilt sich in eine replikative („non-virulente“) und eine transmissive (virulente) Phase (Molofsky und Swanson, 2004) (Abb. 1.1).

Nach der Phagozytose sind die Bakterien in der replikativen Phase. *Legionella* befindet sich in einer nährstoffreichen, membrangebundenen Vakuole „*Legionella* containing vacuole“ (LCV) und unterbindet über das „defect in organelle trafficking/intracellular multiplication“ (*dot/icm*) -System die Einschleusung in den endolysosomalen Weg (Horwitz, 1983; Roy et al., 1998). Stattdessen lagern sich innerhalb weniger Minuten nach der Aufnahme der Bakterien vom Endoplasmatischen Retikulum abgeschnürte Vesikel und Mitochondrien auf der Oberfläche der Vakuole an und die Bakterien beginnen sich zu replizieren (Horwitz, 1983; Kagan und Roy, 2002; Tilney et al., 2001). Während der späten replikativen Phase verschmilzt die Vakuole mit den Lysosomen und stellt somit weitere Nährstoffe für die Replikation zur Verfügung (Sturgill-Koszycki und Swanson, 2000). Die Bakterien sind in der nährstoffreichen, replikativen Phase salzresistent und nicht flagelliert (Byrne und Swanson, 1998; Heuner et al., 1999).

Wenn die Nährstoffe knapp werden, geht *Legionella* in die transmissive Phase über. Die Bakterien sind dann salzsensitiv, zytotoxisch und flagelliert (Byrne und Swanson, 1998). Sie lysieren die Wirtszelle und können die nächste phagozytische Zelle infizieren (Isberg et al., 2009; Molmeret et al., 2004; Molofsky und Swanson, 2004; Swanson und Hammer, 2000).

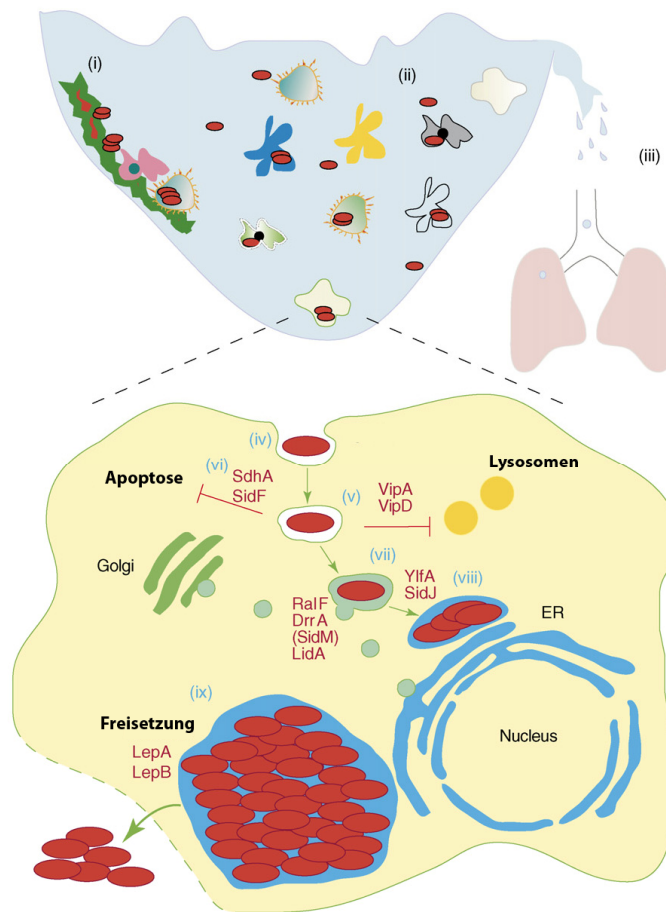


Abb. 1.1 Der Lebenszyklus von *L. pneumophila*. *Legionella* kommt in der Umwelt in Biofilmen (i) oder in planktonischer Form (ii) vor. Die Replikation findet intrazellulär in Protozoen statt. Gelangen Legionellen über eingeatmete Aerosole in die Lunge (iii), so können sie statt Amöben die Alveolarmakrophagen als Wirt nutzen. Nach der Phagozytose (iv) sekretiert *Legionella* Faktoren, die die Ansäuerung der Vakuole (v) und die Apoptose des Makrophagen (vi) verhindern. Weitere Faktoren führen zur Rekrutierung von ER Vesikeln und Mitochondrien (vii). Schließlich verschmilzt die Vakuole mit dem ER (viii). In dieser „replikativen Vakuole“ vermehrt sich *Legionella*, bis die Nährstoffe knapp werden. Dann gehen die Bakterien in die transmissive Phase über, lysieren die Wirtszelle und können den nächsten Makrophagen infizieren (ix). Die an dem jeweiligen Schritt beteiligten *dot/icm* abhängig sekretierten Effektoren sind in der Abbildung in rot benannt (Ninio und Roy, 2007).

Dieser biphasische Lebenszyklus tritt auch bei dem Wachstum in Flüssigmedium auf. Während des exponentiellen Wachstums sind die Bakterien in der replikativen Phase und die stationäre Phase entspricht dem transmissiven Phänotyp (Byrne und Swanson, 1998). Die völlig unterschiedliche Genexpression in der replikativen und der transmissiven Wachstumsphase verdeutlicht ebenfalls den biphasischen Lebenszyklus von *Legionella* (Brüggemann et al., 2006) (Abb. 1.2).



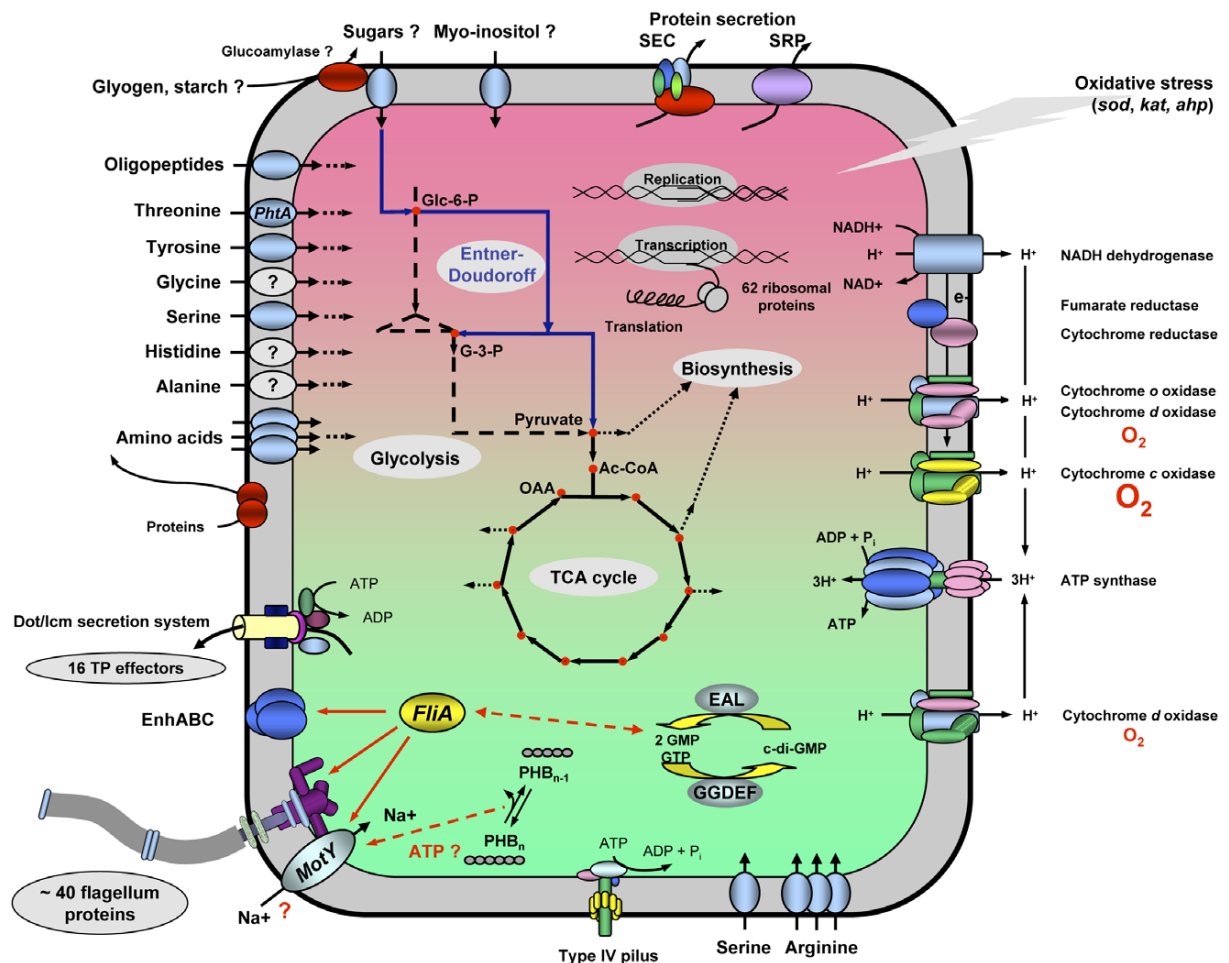


Abb. 1.2 Der Lebenszyklus von *Legionella* auf Transkriptionsebene. In der replikativen Phase hochregulierte Gene sind in pink unterlegt, Gene der transkriptiven Phase in grün. Die wichtigsten replikativen Merkmale sind die Expression von Genen für: Aminosäure und Oligopeptidtransporter, Proteasen, Zucker-Transporter, die Glykolyse und den Entner-Doudoroff-Weg, Sec- und SRP (signal recognition pathway) abhängige Sekretion, Oxidativer Stress-response Proteine und die Replikations-Transkriptions- und Translationsmaschinerie. In der transmissiven Phase hochregulierte Gene codieren für: GGDEF/EAL Proteine, Serin- und Arginintransporter, Typ IV Pilus Biosynthese, Synthese und Degradation von Polyhydroxybutyrat (PHB), Flagellenexpression, invasionsvermittelnde Wege (z.B. EnhABC) und die Sekretion von über das Typ IV *dot/icm* System ausgeschleusten Wirtszellmodulatoren (Jules und Buchrieser, 2007).

### 1.3.1 Die *Legionella* MIF-Form

Neben den unter 1.3 beschriebenen replikativen und transmissiven Formen kann *L. pneumophila* bei der Replikation in Wirtszellen auch in die cystenähnliche „mature intracellular form“ (MIF-Form) übergehen. Die verkürzten Stäbchen lassen sich durch die Giménez-Färbung identifizieren und unterscheiden sich von den replikativen oder stationären Formen morphologisch durch zusätzliche zytoplasmatische Membranen und viele Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrateinschlüsse. Weiterhin sind die MIF-Formen sehr viel virulenter, sowie resistenter gegen Antibiotika und hohe pH-Werte (Faulkner et al., 2008; Garduno et al., 2002). Das MagA-Protein ist ein Marker der MIF-Formen, da es spezifisch während des späten intrazellulären Wachstums exprimiert wird (Hiltz et al., 2004).

## 1.4 Epidemiologie von *L. pneumophila*

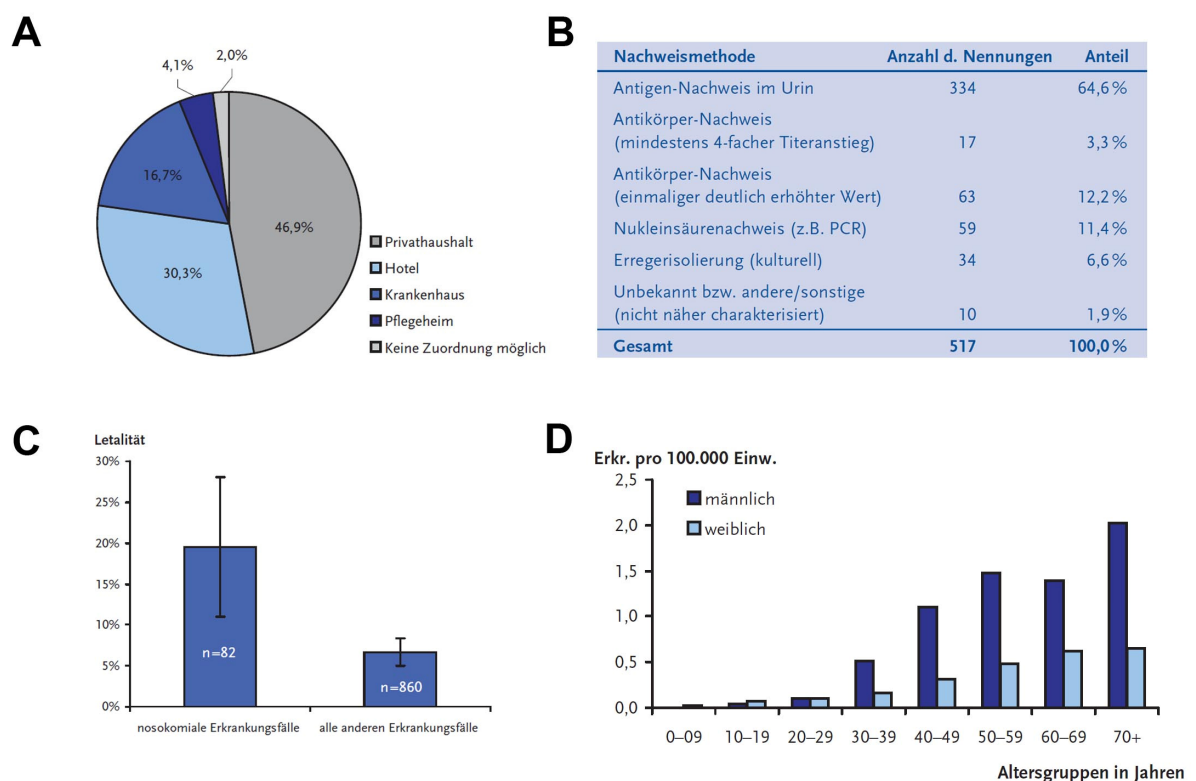
Im Sommer 1976 erkrankten während eines Treffens der „American Legion“ in Philadelphia 182 Teilnehmer und 29 Personen starben an den Folgen einer schwerwiegenden Pneumonie. Das bisher unbekannte Bakterium konnte isoliert werden und wurde *Legionella pneumophila* genannt. Die Bakterien waren über Aerosole aus der Klimaanlage des Hotels verbreitet worden. (Brenner et al., 1979; Fraser et al., 1977; McDade et al., 1977). Durch die zunehmende Technisierung der Gesellschaft haben die Legionelleninfektionen immer weiter zugenommen. Neben Klimaanlagen stellen auch weitere aerosolproduzierende Wassersysteme wie Kühltürme, Duschen, Whirlpools, Raumbefeuchter und zahnärztliche Wasserleitungen eine Gefahr dar (Atlas, 1999; Lück, 2008). Privathaushalte, Hotels und Krankenhäuser sind die häufigsten Infektionsquellen (Abb. 1.3 A und B). Besonders in älteren Wasserleitungen mit stagnierendem Wasserdurchlauf und einer Temperatur von 25-45°C können Legionellen gut überleben. Legionellen können durch Erhitzung der betroffenen Rohrleitungssysteme auf über 60°C wirkungsvoll abgetötet werden.

Nach Schätzungen des „Kompetenznetzwerks für ambulant erworbene Pneumonien“ (CAPNETZ) ([www.capnetz.de](http://www.capnetz.de)) werden in Deutschland etwa 4% aller ambulant erworbenen Pneumonien durch Legionellen verursacht. Somit wären dies ca. 20.000 Fälle pro Jahr, was auf eine starke Untererfassung schließen lässt, da dem Robert Koch-Institut jährlich nur ca. 500 Fälle gemeldet werden (Abb. 1.3 B). Ein Grund hierfür ist die Behandlung der Pneumonien mit Antibiotika ohne eine differenzierte *Legionella*-Diagnostik. Eine monatlich

aktualisierte Übersicht über Legionelleninfektionen in Europa stellt die „European Working Group for *Legionella* Infections“ (EWGLI), [http://www.ewgli.org/data/data\\_tables.htm](http://www.ewgli.org/data/data_tables.htm)) zur Verfügung.

Die jährlich ansteigenden Fallzahlen sind neben der immer weiter verbreiteten Nutzung künstlicher Warmwasser-Systeme auf die verbesserte *Legionella*-Diagnostik (siehe 1.6) und deren Erfassung zurück zu führen. Die vom RKI veröffentlichten aktuellen Daten für Deutschland sind im Infektionsepidemiologischen Jahrbuch des RKI einzusehen ([www.rki.de](http://www.rki.de)).

Nosokomiale Infektionen haben unter anderem deshalb ein erhöhtes Letalitätsrisiko, weil Menschen mit einem alters- oder krankheitsbedingt geschwächten Immunsystem mehr gefährdet sind als gesunde Personen (Abb. 1.3 C). Die Krankheit tritt nur selten bei Kindern auf und Männer sind weitaus häufiger betroffen als Frauen (Abb. 1.3 D).



**Abb. 1.3 Epidemiologische Daten zur Legionärskrankheit in Deutschland 2006/2007.** (A) Privathaushalte und Hotels sind die häufigsten Infektionsquellen für die Legionärskrankheit. (B) Die weitaus meisten Nachweise werden über den Antigen-Nachweis im Urin durchgeführt. Die Erregerkultivierung spielt mittlerweile eine untergeordnete Rolle. (C) Die Letalität liegt bei den nosokomial erworbenen Infektionen weitaus höher als bei ambulant erworbenen Infektionen. (D) Die Anzahl der Erkrankungen nimmt mit dem Alter zu. Männer sind weitaus häufiger betroffen als Frauen (Epidemiologisches Bulletin, 50/2007; Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007, Robert Koch-Institut Berlin, 2008).

## 1.5 Legionellose: Pontiac Fieber und Legionärskrankheit

Das durch *Legionella* hervorgerufene Krankheitsbild wird allgemein als Legionellose bezeichnet, wobei man zwischen der Legionärskrankheit und dem Pontiac Fieber unterscheidet (Diederer, 2008).

**Tabelle 1.1: Charakteristika der Legionärskrankheit und des Pontiac Fiebers**

	<b>Legionärskrankheit</b>	<b>Pontiac Fieber</b>
<b>Klinisches Bild</b>	Lungenentzündung, Husten, Fieber, Körperschmerzen	Grippe-ähnliche Symptome ohne Pneumonie (Fieber, Abgeschlagenheit, Schüttelfrost)
<b>Inkubationszeit</b>	2-14 Tage nach Exposition	1-2 Tage nach Exposition
<b>Infektionsrate bei exponierten Personen</b>	< 5%	> 90%
<b>Isolation der Bakterien</b>	möglich	nahezu nie
<b>Todesfälle</b>	5 -40%	0%

(Quelle: [www.cdc.gov/Legionella/top10.htm](http://www.cdc.gov/Legionella/top10.htm))

Die Legionärskrankheit hat eine kürzere Inkubationszeit und äußert sich in hohem Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen und schließlich einer Lungenentzündung. In schweren Fällen kommt es zu Schädigungen der Nieren, des Zentralen Nervensystems mit Verwirrtheit und Delirium (Fields et al., 2002). Der Tod tritt durch respiratorische Insuffizienz und Sepsis ein (Edelstein, 2008). Das Pontiac-Fieber zeigt grippe-ähnliche Symptome, die aber ohne Behandlung wieder abklingen (Fields et al., 2002) (Tabelle 1.1). Eine Mensch-zu-Mensch Übertragung konnte bisher nicht festgestellt werden (Fields, 1996; Katz et al., 1982).

## 1.6 Diagnostik und Therapie

Anhand von Symptomen oder Röntgenaufnahmen ist es nicht möglich, eine Legionelleninfektion klar von durch andere Erreger verursachten Pneumonien zu unterscheiden (Fields et al., 2002). Daher ist die klassische Methode zum Nachweis einer Infektion ist die Kultivierung von Legionellen aus respiratorischen Materialien, Lungengewebe oder Pleuraflüssigkeit mit einer Sensitivität/Spezifität von 80/100% (Abb. 1.3 B). Beweisend ist auch der Nachweis von *Legionella*-Antigenen im Urin mittels ELISA, wobei mit dieser Methode bei einer Sensitivität/Spezifität von 70/100% meist nur *L. pneumophila* der Serogruppe 1 detektiert werden. Weiterhin kann *Legionella* über direkte

Immunfluoreszenz mit der „direct fluorescent antibody testing“ (DFA) Methode detektiert werden. Hier liegt die Sensitivität/Spezifität allerdings nur bei 25-75/95%. Weiterhin wird der Nachweis auch zunehmend über die Detektion von *Legionella*-DNA per PCR durchgeführt, wobei die Sensitivität hier sehr schwankt, aber allgemein als „gut“ bewertet wird. (<http://www.hpa.org.uk>; [http://www.tu-dresden.de/medimmh/konsiliarlabor\\_legionellen.html](http://www.tu-dresden.de/medimmh/konsiliarlabor_legionellen.html); <http://www.rki.de>) (Lück und Steinert, 2006; Lück, 2008).

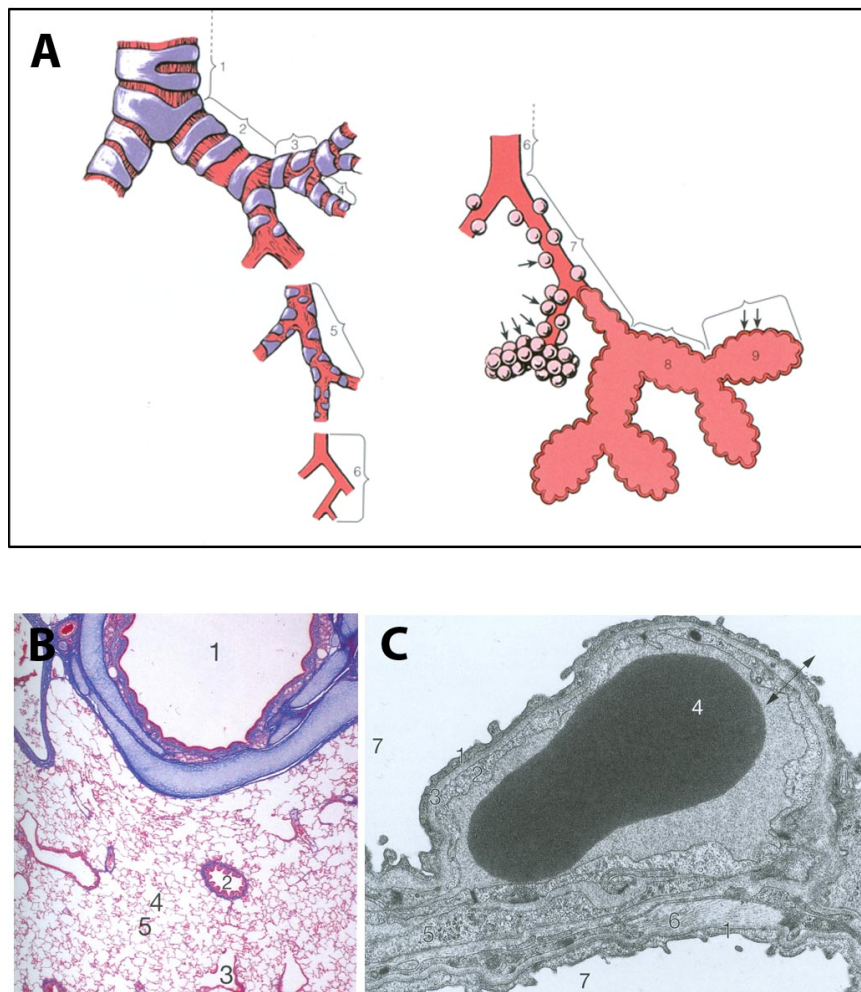
Zur epidemiologischen Untersuchung der gemeldeten Legionellose-Ausbrüche werden die Proben näher charakterisiert. Dabei wird die Spezies über die Sequenzierung des *mip*-Gens und den Abgleich mit einer Datenbank unter [http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip\\_ID.html](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip_ID.html)

bestimmt (Ratcliff et al., 1998). Mit Hilfe von Antikörpern kann die Serogruppe der Probe identifiziert werden. Für die Überprüfung der Ergebnisse stehen zahlreiche sequenzbasierte Methoden wie „pulsed-field gel electrophoresis“ (PFGE), „ampified fragment length polymorphism“ (AFLP) und „sequencing-based typing“ (SBT) zur Verfügung (Edwards et al., 2008; Fry et al., 1999; Fry et al., 2002; Gaia et al., 2005).

Die Legionärskrankheit wird allgemein mit dem Antibiotikum Erythromycin behandelt. Bei schweren Fällen ist die zusätzliche Gabe von Rifampicin empfehlenswert. Die Behandlungsdauer sollte mindestens 14 Tage, bei immunsupprimierten Patienten 3 Wochen betragen. Da neuere Makrolidantibiotika (z.B. Azithromycin, Clarithromycin) und Fluorochinolone (z.B. Ciprofloxacin, Moxifloxacin) eine schnellere bakterizide Wirkung haben, sind sie besonders bei immunsupprimierten Patienten zu empfehlen. Bei Pontiac-Fieber ist dagegen keine Antibiotikagabe notwendig ([www.rki.de](http://www.rki.de)) (Ewig et al., 2002; Lück und Steinert, 2006; Mandell et al., 2003).

## 1.7 Der Atmungsapparat

Eingeatmete Aerosole gelangen über die Luftröhre (Trachea) in die Lunge (Pulmo) (Abb. 1.4). Dort teilt sie sich in zwei Stammbronchien (Bronchi principales), die sich in die intrapulmonalen Lappenbronchien (Bronchi lobares) aufzweigen. In den Lungenlappen verästeln sie sich weiter und gehen in die kleineren Bronchien (Bronchioli veri) und schließlich in die Endbronchiolen (Bronchioli terminales) über.



**Abb. 1.4 Bronchialsystem und Histologie der Lunge.** (A) vereinfachte Darstellung des menschlichen Bronchialsystems. (1) Trachea, (2) Stammbronchus, (3) Lappenbronchus, (4) Segmentbronchus, (5) kleiner Bronchus, (6) Bronchiolus, (7) Bronchiolus respiratorius, (8) Ductus Alveolaris, (9) Sacculus alveolaris, (Pfeil) Alveolen, blau: Knorpel in der Wand der Atemwege. (B) Lungengewebe. (1) Bronchus, (2) Bronchiolus, (3) Bronchiolus terminalis übergehend in Bronchioli respiratorii, (4) Ductus alveolaris, (5) Alveolen. (C) Blut-Luft-Schranke. Menschliches Alveolareseptum mit Blutkapillare, die sich von innen eng anlegt. (1), Alveolarepithel (2) Kapillarendothel. (3) gemeinsame Basallamina, (4) Erythrozyt in der Kapillare, (5) Fibrozyt, (6) Kollagenfibrillen, (7) Luftraum der Alveolen. (Pfeil) Blut-Luft-Schranke. (Welsch, 2003).

An die Endbronchiolen schließt sich das respiratorische System an. Die Wände der hier liegenden Bronchiolen (Bronchioli respiratorii/alveolares) haben sackartige Ausstülpungen (Alveolen, Alveoli pulmonis). Durch weitere Aufzweigung entstehen luftgefüllte, vollständig mit Alveolen besetzte Gänge (Ductus alveolares), die in die Alveolarsäckchen (Sacculi alveolares) übergehen. Die Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I sind sehr dünne, organellarme Deckzellen, die der Basalmembran aufliegen und 95% der inneren Alveolaroberfläche auskleiden. Die Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ II sind kugelförmige, organellreiche Zellen. Sie sekretieren den oberflächenaktiven Phospholipidfilm (Surfactant) der Alveolen. Über die Blut-Luft-Schranke der Alveolen werden die Atemgase ausgetauscht (Abb. 1.4 C). Der Gasaustausch von der Alveole bis in die Erythrozyten erfolgt durch den Surfactantfilm, das Alveolarepithel, die gemeinsame Basallamina von Alveolarepithel und Kapillarwand, das Endothels der Kapillarwand und schließlich durch das Plasmalemm des Erythrozyten (Liebich, 1999).

### **1.7.1 Der Lungensurfactant**

Der Lungensurfactant wird von Typ II Alveolarepithelzellen produziert und besteht aus 50% Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), 25% ungesättigten Phosphatidylcholinen, 5-10% Phosphatidylglycerol, 5% Cholesterol und 5-10% Proteinen. Dieser Oberflächenfilm ist für die Lungenfunktion absolut notwendig. So ermöglicht das DPPC den Atemvorgang, indem es die Oberflächenspannung der Grenzschicht zwischen Luft und Lungengewebe reduziert, die Lunge stabilisiert das Verkleben der Lungenbläschen beim Ausatmen verhindert (King, 1982). Weiterhin schützt der Surfactant die Lunge vor eindringenden Pathogenen. Die Surfactant-Proteine sind ein Teil der angeborenen Immunabwehr der Lunge (Pison et al., 1996; Whitsett, 2005). Die Funktion des Lungensurfactant kann durch Phospholipasen zerstört werden (siehe 1.11) (Holm et al., 1991).

## 1.8 Histologie der Legionärskrankheit im Meerschweinchenmodell

Für *in vivo* Untersuchungen der Legionärskrankheit ist das Meerschweinchenmodell gut geeignet, da der Krankheitsverlauf und das histopathologische Bild gut mit der Infektion beim Menschen zu vergleichen ist (Baskerville et al., 1983; Davis et al., 1983; Davis et al., 1983).

Da *Legionella* durch das Einatmen kontaminierter Aerosole über die Bronchien und Bronchiolen in die Lunge gelangt, wird diese Form der Lungenentzündung auch als Bronchopneumonie bezeichnet. Typisch für den Verlauf sind zunächst lokal begrenzte peribronchiale Infektionsherde in der Lunge (lobuläre Pneumonie oder Herdpneumonie). Schließlich breitet sich die Infektion zu einer konfluenten Bronchopneumonie aus (Davis et al., 1983; Jepras et al., 1985; Twisk-Meijssen et al., 1987). In den sonst luftgefüllten Alveolen befindet sich fibrin-reiches Exsudat mit Granulozyten, Makrophagen und Zelltrümmern (Hambleton et al., 1985).

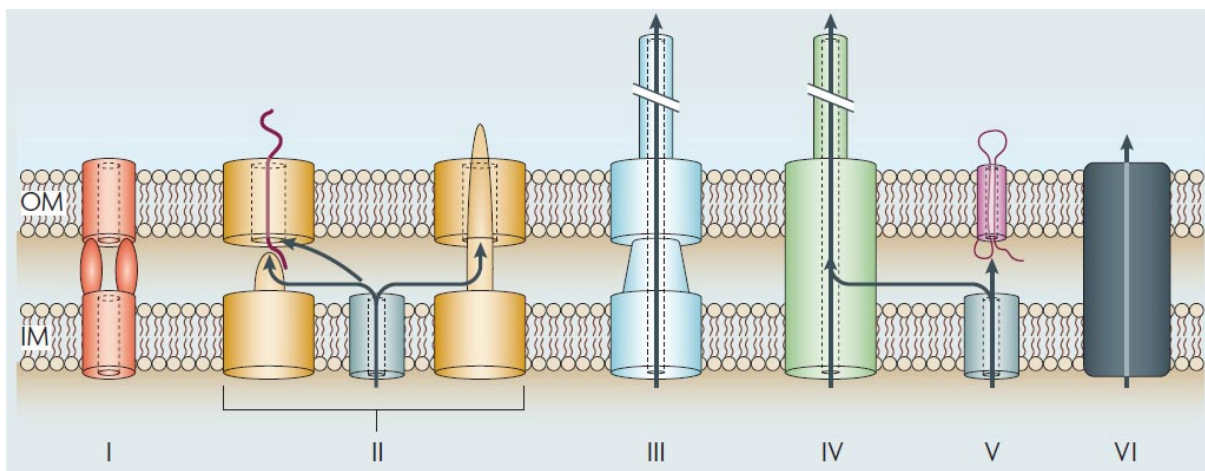
Bereits einen Tag nach der Infektion der Meerschweinchen werden infolge von Bakteriämie Legionellen in der Leber, Milz und den Nieren nachgewiesen (Jepras et al., 1985). Die Anzahl der Bakterien im Blut und in der Lunge nimmt in den folgenden Tagen weiter zu, wobei nach ein paar Tagen keine Erreger in den extrapulmonalen Organen gefunden werden (Jepras et al., 1985; Twisk-Meijssen et al., 1987).



## 1.9 Proteinsekretionssysteme und Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

### 1.9.1 Proteinsekretionssysteme

Die Sekretion von Proteinen über die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist ein räumliches und energetisches Problem. Bisher sind die Sekretionssysteme I bis VI (T1SS-T6SS) bekannt, die den Proteintransport über die Membranbarriere ermöglichen.



**Abb. 1.5 Typ I-VI Sekretionssysteme bei Gram-negativen Bakterien.** Bei den Sekretionssystemen des Typ I, III, IV und wahrscheinlich VI verläuft die Sekretion in einem Schritt über beide Membranen und den periplasmatischen Raum. Die Typ II Sekretion verläuft Sec- oder Tat-abhängig über die innere Membran ins Periplasma und von dort aus durch eine Pore über die äußere Membran. Bei der Typ III Sekretion wird das Substrat kontaktabhängig direkt in die Wirtszelle sekretiert. Die Typ IV Systeme können DNA oder Proteine in die Wirtszelle oder ins extrazelluläre Milieu sekretieren. Die Typ V Translokation über die innere Membran verläuft Sec-abhängig. Die Pore in der äußeren Membran wird durch ein zweites Protein oder eine Domäne des sekretierten Proteins selbst gebildet (Abdallah et al., 2007). (IM) innere Membran, (OM) äußere Membran.

Der Transport über die Systeme I, III, IV und wahrscheinlich VI erfolgt im Allgemeinen ohne periplasmatische Zwischenstufe. Bei der Sekretion über den Typ II und V gelangen die Proteine über den Sec- oder Tat- abhängigen Transport aus dem Zytoplasma ins Periplasma und werden von dort aus durch die äußere Membran geschleust. Durch den Kontakt mit einer Wirtszelle injizieren Bakterien über das T3SS Substrate direkt in die Wirtszelle. T4SS sind wichtig für die Konjugation und zum Transport von Nukleinsäuren und Proteinen in die Wirtszellen (Nagai und Roy, 2003; Sexton und Vogel, 2002). Typ V Substrate sind Autotransporter (Lee und Schneewind, 2001). Der genaue Mechanismus des T6SS ist noch nicht bekannt (Filloux et al., 2008). Für die volle Virulenz von *Legionella* sind mindestens das T2SS und das T4SS absolut notwendig (Cianciotto, 2001; Cianciotto, 2005; De Buck et al., 2007; Gerlach und Hensel, 2007).

### 1.9.1.1 Translokation über die innere Membran

Proteine, die über den zweistufigen Transport sekretiert werden, weisen eine N-terminale, hydrophobe Signalsequenz auf. Diese Signalsequenz leitet das Protein im Zytosol zur Membran und verankert es beim Durchtritt zunächst darin. Die membrangebundene Signalpeptidase hydrolysiert eine Peptidbindung am Ende der Signalsequenz und entlässt so das durch die Membran geschleuste Protein ins Periplasma. Bei dem „general secretory pathway“ (Sec-abhängigen Transport) werden die Proteine mit Hilfe von Chaperonen im ungefalteten Zustand durch die innere Membran transportiert, während beim „twin-arginine translocation pathway“ (Tat-abhängiger Transport) gefaltete Proteine vom Zytosol ins Periplasma gelangen (Berks et al., 2005; Lengeler, 1999). Tat-abhängige Vorläuferpeptide haben zwei Argininreste in einem Konsensusmotiv zwischen der positiv geladenen N-terminalen Region und dem hydrophoben Bereich des Signalpeptids. Die Sec-abhängigen Signalpeptide ähneln sich strukturell, weisen aber keine Konsensussequenz auf (Bendtsen et al., 2005; Dilks et al., 2003). In *L. pneumophila* existieren sowohl das Sec- als auch das Tat-abhängige Sekretionssystem. Über den Sec-abhängigen Weg werden die meisten extrazellulären Proteine über die innere Membran gebracht. Der Tat-abhängige Weg wird mit der Biofilmbildung, dem Wachstum in Makrophagen und Amöben und dem Wachstum bei niedrigen Eisenkonzentrationen in Verbindung gebracht (De Buck et al., 2007; Rossier und Cianciotto, 2005)

### 1.9.1.2 Das putative Typ I Sekretionssystem

Typ I Sekretionssysteme (T1SS) bestehen aus einem ABC-Transporter mit einer ATP-Bindekassette in der inneren Membran, einem das Periplasma durchspannenden Membranfusionsprotein und einer Pore in der äußeren Membran. Die Substrate besitzen eine carboxyterminale Signalsequenz, die nicht abgespalten wird. Ein Beispiel ist das  $\alpha$ -Hämolysin von *E. coli* (Delepelaire, 2004). Für *Legionella* ist ein putatives *lss* T1SS beschrieben, das vom *lssXYZABD* Locus kodiert wird. Demnach ist das LssB-Protein der in der inneren Membran verankerte ABC-Transporter und LssD das Membranfusionsprotein. Bisher ist noch kein Substrat für T1SS in *Legionella* bekannt (Albert et al., 2006; Jacobi und Heuner, 2003).

### 1.9.1.3 Typ II Sekretion

Substrate des Typ II Sekretionssystems (T2SS) werden nach dem Tat- oder Sec abhängigen Transport über die innere Membran im Periplasma vollständig gefaltet. Es wird angenommen, dass eine in der inneren Membran sitzende kolbenartige Struktur das Protein vom Periplasma aus durch eine Pore in der äußeren Membran drückt. Dieses Sekretionssystem wurde zuerst bei der Pullulanase von *Klebsiella oxytoca* nachgewiesen (Johnson et al., 2006).

Das *L. pneumophila* PilD-abhängige „*Legionella* secretion pathway“ (*lsp*) T2SS wird von *lsp*FGHIJK, *lsp*DE, *lsp*C, *lsp*L und *lsp*M codiert. LspD bildet die Pore in der äußeren Membran und LspE ist die ATPase des Systems. T2SS-Mutanten zeigen sowohl in Makrophagen und Protozoen als auch im Tiermodell eine verminderte Replikation und sind somit virulenzattenuiert (Aragon et al., 2000; Hales und Shuman, 1999; Liles et al., 1999; Rossier und Cianciotto, 2001; Rossier et al., 2004). Weiterhin ist dieses System für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen wichtig (Soderberg et al., 2004). Zusätzlich spielt das *lsp* T2SS eine Rolle bei der Kolonisierung und Etablierung von Biofilmen durch *L. pneumophila* (Lucas et al., 2006).

### 1.9.1.4 Typ III Sekretion

Beim Typ III Sekretionssystem (T3SS) werden die Substrate bei Kontakt mit einer Wirtszelle durch eine nadelähnliche Struktur aus dem Zytosol direkt in die Wirtszelle injiziert. Die Proteine modulieren den Wirt dann zu ihrem Vorteil. Ein Beispiel sind die Yop-Proteine von *Yersinia enterocolitica* (Coburn et al., 2007).

Der Flagellen-Apparat ist sehr homolog zu den Komponenten des T3SS. Es konnte gezeigt werden, dass der Flagellen-Apparat neben dem Transport der Flagellenuntereinheiten auch andere Effektorproteine über die Membranen transportieren kann. Daher spricht man bei der Sekretion durch den Flagellinapparat von einer Typ III-ähnlichen Sekretion (Young et al., 1999).

Für *Legionella* ist neben dem Flagellensystem derzeit noch keine Sekretion nach Typ III beschrieben.

### 1.9.1.5 Typ IV Sekretion

Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) bestehen aus einem das Periplasma überspannendem Kanal, einer Pore in der äußeren Membran und einer Pilus-ähnlichen Struktur auf der Bakterienoberfläche, über die der Kontakt zur Wirtszelle hergestellt wird. Das T4SS ist in 2 Subklassen der T4ASS und T4BSS unterteilt (Christie und Vogel, 2000). T4ASS (oder *vir*-Systeme) zeigen eine große Homologie zu dem *vir* System von *A. tumefaciens*. Über das T4SS werden zahlreiche Virulenzfaktoren transportiert. Ein Beispiel ist die kontaktabhängige Sekretion über den Typ IVA ist das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis*. Für das T4BSS wurden bisher nur in *Legionella* Substrate beschrieben (Christie et al., 2005; Juhas et al., 2008; Segal et al., 2005).

Die T4ASS ermöglichen den DNA Transfer, sind aber nicht in allen *Legionella*-Stämmen vorhanden (Glöckner et al., 2008). Das „*Legionella vir* homolog“ (*lvh*) T4ASS spielt eine Rolle während der Wirtszellinfektion bei niedrigen Temperaturen (Ridenour et al., 2003). Zwei weitere putative T4ASS sind auf den genomischen Inseln Trb-1 und Trb-2 lokalisiert und ermöglichen den Austausch von DNA auch zwischen unterschiedlichen *Legionella* Spezies (Glöckner et al., 2008).

Das *dot/icm* T4BSS Sekretionssystem ist das wichtigste virulenz-assoziierte Sekretionssystem in *Legionella*. T4BSS-Mutanten haben einen Defekt in den *dot* (defect in organelle trafficking) oder *icm* (intracellular multiplication) Genen (Berger und Isberg, 1993; Marra et al., 1992). Das T4BSS ist unter anderem notwendig für die Phagozytose der Bakterien, die Etablierung der replikativen Vakuole, der Induktion von Apoptose und der Lyse der Wirtszelle (Ensminger und Isberg, 2009; Molmeret et al., 2007). Ein Replikationsdefekt konnte sowohl in Amöben und Makrophagen als auch im Meerschweinchenmodell nachgewiesen werden (Edelstein et al., 1999; Ninio und Roy, 2007; Segal und Shuman, 1999). Unter bestimmten Bedingungen kann ein defektes T4BSS durch das T4ASS ersetzt werden, wodurch der virulente Phänotyp erhalten bleibt (Bandyopadhyay et al., 2007; Segal et al., 1999). Das DotA-Protein ist ein struktureller Bestandteil der T4BSS Sekretionsmaschinerie (Roy und Isberg, 1997).

### 1.9.1.6 Das putative Typ V Autotransportersystem

Die Typ V Sekretion ist ein zwei-stufiger Prozess, bei dem nach dem Sec-abhängigen Transport über die innere Membran die C-terminale Domäne des Substrates eine Pore in der äußeren Membran bildet und das restliche Protein hindurch schleust (Typ VA und C). Statt der Autotransporterdomäne kann auch ein zweites Protein die Pore bilden (Typ VB) (Desvaux et al., 2004; Henderson et al., 2004).

*In silico* Analysen konnten ein solches System bisher nur in *L. pneumophila* Paris identifizieren (Albert-Weissenberger et al., 2007).

### 1.9.1.7 Typ VI Sekretion

Das Typ VI Sekretionssystem wurde vor kurzem bei *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Da die Virulenzfaktoren keine N-terminale Signalsequenz besitzen, werden sie wahrscheinlich ohne periplasmatische Zwischenstufe transportiert (Filloux et al., 2008). *In silico* Analysen konnten für *Legionella* bisher kein T6SS detektieren (Shrivastava und Mande, 2008).

## 1.9.2 Virulenzfaktoren

### 1.9.2.1 Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von *Legionella*

Die Phagozytose von *Legionella* durch humane Makrophagen wird durch das „major outer membrane protein“ (MOMP) vermittelt. Dabei bindet MOMP an das C3R-Protein des Komplementsystems. Der Komplement Rezeptor CR1 bindet an CR3, was zur Aufnahme der Bakterien führt (Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990; Payne und Horwitz, 1987). Die ebenfalls mögliche Komplement-unabhängige Aufnahme durch Alveolarmakrophagen findet über Carbohydrat- oder Lipidstrukturen auf der bakteriellen Oberfläche statt (Gibson et al., 1994). Für die Infektion von Amöben konnte bisher gezeigt werden, dass Typ IV Pili und das Hsp-60 Protein (heat shock protein 60 kD) eine Rolle für die Kontaktaufnahme spielen (Garduno et al., 1998; Stone und Abu Kwaik, 1998). Die Adhäsion und die Aufnahme der Bakterien wird außerdem durch *ligA* („*Legionella pneumophila* infectivity gene A“) (

beeinflusst (Fettes et al., 2000). Der „macrophage infectivity potentiator“ (Mip-Protein) ist eine „peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase“ (PPIase) und hat p-Nitrophenylphosphorylcholin (p-NPPC) Hydrolase Aktivität. Mip ermöglicht *Legionella* die Kolonisierung der Lunge und die Ausbreitung in periphere Organe wie die Milz. Weiterhin bindet Mip *in vitro* an die Kollagene der extrazellulären Matrix von Lungenepithelzellen und ermöglicht den Durchtritt der Bakterien durch die Lungenepithelzellbarriere (Debroy et al., 2006; Helbig et al., 2003; Helbig et al., 2001; Köhler et al., 2003; Wagner et al., 2007; Wintermeyer et al., 1995).

In der transmissiven Phase ist *Legionella* monopolar begeißelt. Neben der Fortbewegung ist die Flagelle wichtig bei der Invasion der Bakterien in Amöben und der makrophagenähnlichen Zelllinie HL-60 (Dietrich et al., 2001). Andererseits wird *Legionella* über die Bindung der Flagellin-Untereinheit FlaA an Zytosolische Rezeptoren von Makrophagen erkannt. Der Zelltod des Makrophagen wird eingeleitet und so das angeborene Immunsystem aktiviert (Lightfield et al., 2008; Molofsky et al., 2005; Vinzing et al., 2008).

### 1.9.2.2 Sekretierte Virulenzfaktoren von *Legionella*

Nach der Aufnahme in die Wirtszelle sekretiert *Legionella* über das *dot/icm* T4BSS verschiedene Effektoren, um die Phagosom-Lysosom Verschmelzung zu verhindern und die replikative Vakuole aufzubauen (siehe 1.9.1.5 und 1.3). Am Aufbau der replikativen Vakuole sind beispielsweise die Effektoren YlfA (Campodonico et al., 2005), LidA (Conover et al., 2003; Machner und Isberg, 2006), RalF (Nagai et al., 2002), Sid C (Weber et al., 2006), Sid J (Liu und Luo, 2007), Sid M (Machner und Isberg, 2007), Vip A, VipD und Vip E beteiligt (Shohdy et al., 2005). Antiapoptotische Faktoren sind SdhA (Laguna et al., 2006) und SidF (Banga et al., 2007). Die nicht-lytische Freisetzung der Legionellen aus Protozoen wird durch LepA und LepB vermittelt (Chen et al., 2007) (siehe auch 1.11).

Neben der *dot/icm* Typ IVB vermittelten Sekretion werden Virulenzfaktoren auch über das *lsp* T2SS aus den Bakterien geschleust. Diese sind unter anderem die Msp-Protease (Msp, codiert durch *proA*) (Hales und Shuman, 1999), Saure Phosphatase (Aragon et al., 2001), Lipase (Lip A und B) (Aragon et al., 2002), Phospholipase A/Lysophospholipase (PlaA und PlaC) (Banerji et al., 2005; Flieger et al., 2002), Phospholipase C (Aragon et al., 2002), RNase (Rossier et al., 2009) und Chitinase (DebRoy et al., 2006).

Seit der Etablierung des Meerschweinchenmodells (siehe 1.8) konnten zahlreiche *in vitro* Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* auch *in vivo* bestätigt werden. Zu diesen Faktoren

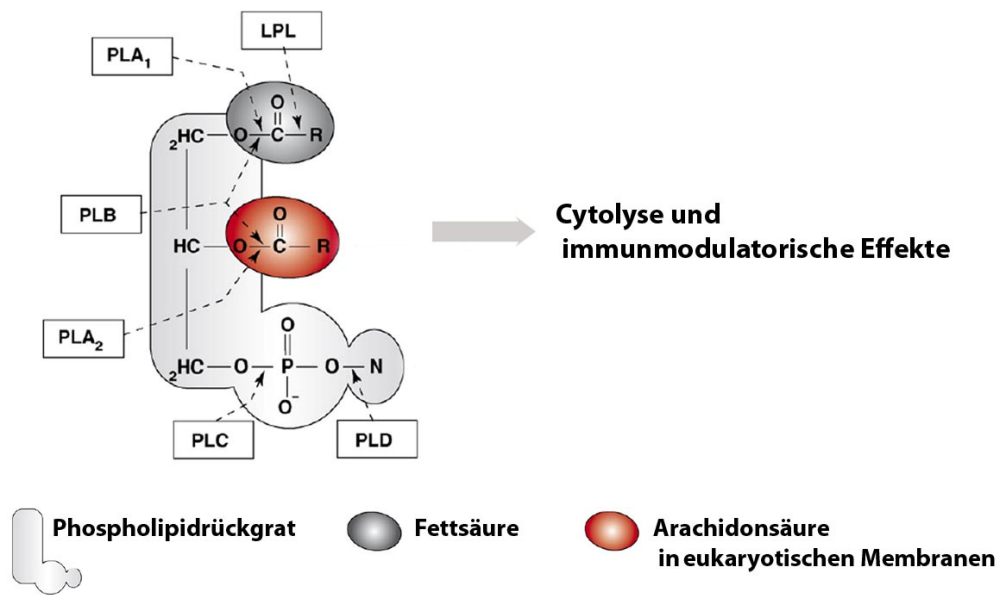
gehören MspA (Moffat et al., 1994), Mip (Wagner et al., 2007), Hsp60 und OmpS (Weeratna et al., 1994), die Nudix-Hydrolase NudA (Edelstein et al., 2005) und LvgA (Edelstein et al., 2003). Des Weiteren werden Phospholipasen als Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila* diskutiert. Für andere Mikroorganismen wurde ihre *in vivo* Bedeutung bereits beschrieben (siehe 1.11).

## 1.10 Klassifizierung von Lipasen und Phospholipasen

Bakterielle Lipasen können prinzipiell nach ihrer Substratspezifität und der Hydrolyseposition oder nach ihrer Aminosäuresequenzhomologie eingeteilt werden (Banerji et al., 2008; Bender et al., 2009).

### 1.10.1 Klassifikation von Lipasen nach Substratspezifität und der Hydrolyseposition

Lipasen ist Esterasen, die die Hydrolyse von Acylesterbindungen katalysieren. Dabei werden freie Fettsäuren von einem Mono-, Di-, oder Triglycerolrückgrat freigesetzt. Phospholipasen sind eine Subklasse der Lipasen und spalten ihre Substrate, die Phospholipide an verschiedenen Positionen. Phospholipide bestehen aus einem Glycerolrückgrat, an dessen Hydroxylgruppen zwei Fettsäuren und ein Phosphat esterartig verbunden sind. Phospholipasen A<sub>1</sub> bzw. A<sub>2</sub> hydrolysieren die Carboxylesterbindungen an den *sn*-1 bzw. *sn*-2 Positionen. Phospholipasen B können an beiden Positionen Fettsäuren abspalten und erzeugen nach Abspaltung einer Fettsäure ein Lysophospholipid. Lysophospholipasen können die verbleibende Fettsäure vom Glycerolrückgrat entfernen. Phospholipasen C und D die spalten den Phosphoester an der Glycerol-orientierten bzw. der Alkohol-orientierten Seite (Schmiel und Miller, 1999; Sitkiewicz et al., 2007) (Abb. 1.6). Die Hydrolyse von Membranphospholipiden kann zur Lyse der Zelle führen. Weiterhin können freigesetzte Fettsäuren und Lysophospholipide immunmodulatorisch wirken (siehe 1.11).



**Abb. 1.6 Klassifizierung der Phospholipasen nach Hydrolyseposition in Phospholipiden.** Phospholipasen A hydrolysieren Carboxylesterbindungen an den *sn-1* bzw. *sn-2* Positionen (PLA<sub>1</sub> und PLA<sub>2</sub>). Phospholipasen B können sowohl an der *sn-1* als auch an der *sn-2* Position angreifen (PLB). Phospholipasen C spalten innerhalb der Phosphatgruppe (PLC) und Phospholipasen D an der Alkohol-orientierten Seite (PLD). Modifiziert nach (Sitkiewicz et al., 2007).

Einige Lipasen haben zusätzliche Acyltransferaseaktivität. Diese Enzyme übertragen Acylreste an einen geeigneten Akzeptor. Dies kann unter anderem Cholesterol sein, das ein wichtiger Bestandteil eukaryotischer Membranen ist.

### 1.10.2 Klassifikation von Lipasen nach ihrer Aminosäuresequenzhomologie

Diese Art der Klassifikation wurde von Arpigny und Jaeger eingeführt (Arpigny und Jaeger, 1999). Danach gibt es insgesamt acht Familien und deren Enzyme haben eine katalytische Triade der Aminosäuren Ser-Asp-His und die typische Faltung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Superfamilie. Es kommen aber auch Ser-Glu-His Triaden oder katalytische Diaden vor (Arpigny und Jaeger, 1999; Rydel et al., 2003; Vernet et al., 1993).

Bei Familie I Lipasen ist das Serin der katalytischen Triade in ein Gly-X-Ser-X-Gly Motiv eingefügt. Sie werden als „echte“ Lipasen bezeichnet.

Bei Familie II Lipasen ist das dieses Serin in ein Gly-Asp-Ser-(Leu/Ileu) Motiv eingefügt. Daher werden sie als GDSL Esterasen bezeichnet. Diese Enzyme besitzen 5 Blöcke mit konservierten Aminosäuren. Enzyme dieser Klasse können statt einer katalytischen Triade auch nur eine katalytische Diade mit Serin und Histidin haben (Upton und Buckley, 1995).

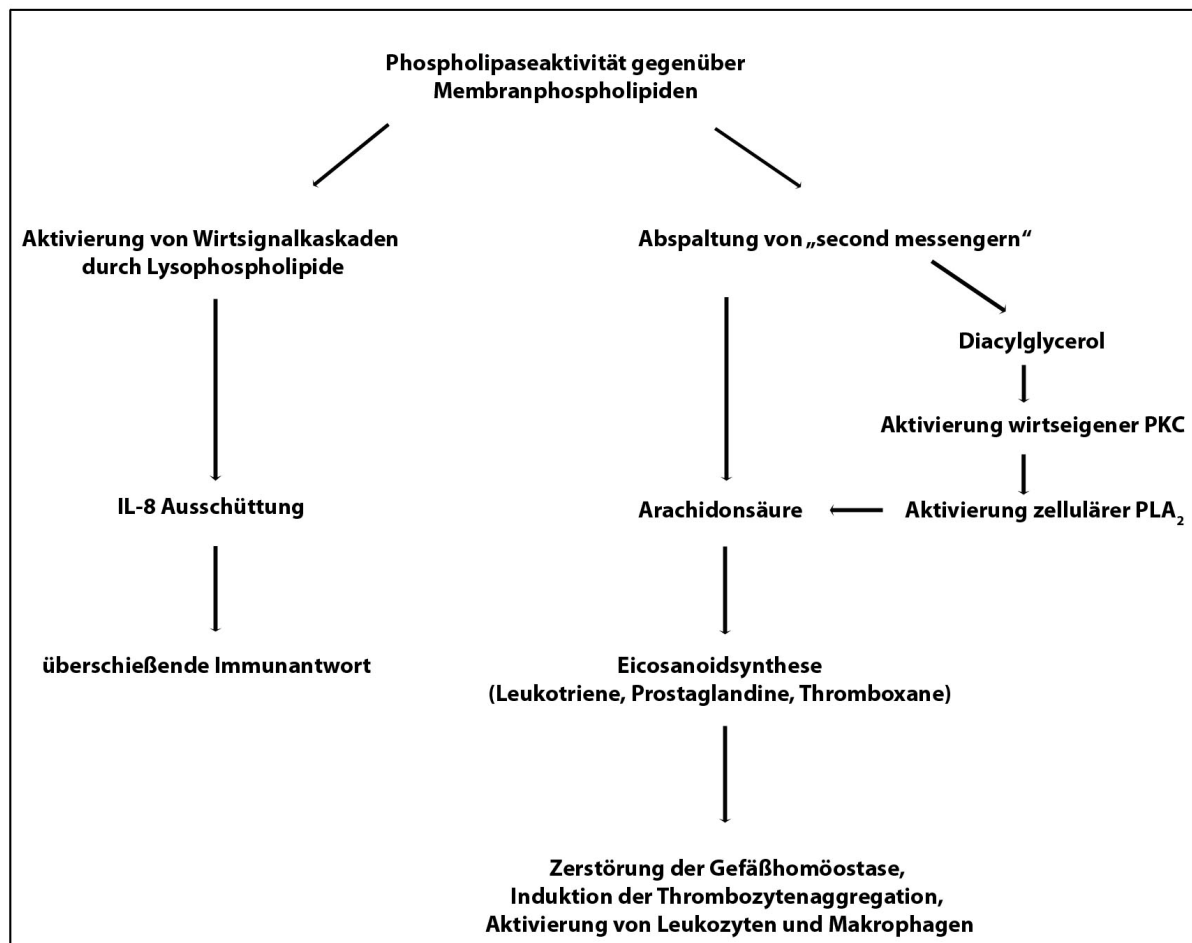


Familie III-VIII Lipasen sind aufgrund ihrer Homologien zu bestimmten Proteinen in die verschiedenen Familien eingeordnet.

Diese Klassifizierung ist kürzlich um die Familie der „Patatin-ähnlichen“ Proteine erweitert worden. Patatin-ähnliche Proteine haben eine katalytische Diade aus Serin und Aspartat. Das katalytisch aktive Serin ist in ein für Familie I Lipasen typisches Gly-X-Ser-X-Gly Motiv eingebettet und liegt in einem konservierten Aminosäuresequenzblock. Insgesamt liegen vier konservierte Aminosäuresequenzblöcke vor (Andrews et al., 1988; Banerji und Flieger, 2004).

### **1.11 Phospholipasen als Pathogenitätsfaktoren**

Phospholipasen tragen zur Pathogenität verschiedenster Bakterien, Pilze, eukaryotischer Parasiten und Viren bei (Chayakulkeeree et al., 2008; Cox et al., 2001; Farn et al., 2001; Ghannoum, 2000). Zum einen können Phospholipasen direkt zur Zellyse führen, da sie Poren in die Wirtsmembran einfügen oder über die von ihnen produzierten Lysophospholipide zytotoxisch wirken (Weltzien, 1979). Lysophospholipide binden auch an spezifische Rezeptoren auf Immunzellen, können Umlagerungen des Cytoskeletts induzieren, chemotaktisch auf Immunzellen einwirken und sie zur Proliferation und Differenzierung anregen (Graler und Goetzl, 2002). Besonders für intrazelluläre Erreger sind Phospholipasen wichtige Pathogenitätsfaktoren, da sie sich mit ihrer Hilfe aus dem Phagosom oder der Wirtszelle befreien können (Plotkowski und Meirelles, 1997; Smith et al., 1995). Zum anderen modulieren Phospholipasen die Immunantwort des Wirts, indem sie „second messenger“ wie Diacylglycerol oder den Eicosanoidvorläufer Arachidonsäure freisetzen (Abb. 1.7). Aus Arachidonsäure werden Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane gebildet. Eine vermehrte Ausschüttung dieser Botenstoffe beeinflusst die Weite und Durchlässigkeit der Blutgefäße und damit auch das Ausmaß der Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe. Weiterhin können Phospholipasen Signalkaskaden der Wirtszellen anschalten, wodurch Interleukin-8 ausgeschüttet wird und die Immunreaktion weiter verstärkt wird (Bender und Flieger, 2009 (in press); Schmiel und Miller, 1999; Sitkiewicz et al., 2007). Lysophosphatidylcholin kann Apoptosevorgänge verändern und neben der direkten Zellyse die Proliferation, Differenzierung und chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsherd hervorrufen (Kume et al., 1992; Masamune et al., 2001).



**Abb. 1.7 Immunmodulatorischer Effekt durch Phospholipaseaktivität.** Bakterien können durch sublytische Konzentrationen der Phospholipasen modulierend auf das Immunsystem des Wirtes wirken und sich so optimale Bedingungen zur Vermehrung und Ausbreitung schaffen. Nicht gezeigt ist die direkte cytolytische Wirkung durch Porenbildung.

Das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens* ist eine Phospholipase C, für welche die Funktion als Virulenzfaktor im Detail aufgeklärt werden konnte. *C. perfringens* ist ein Gram-positiver strikter Anaerobier, der unter anderem eine schwerwiegende Wundinfektion, den sogenannten Gasbrand verursachen kann. Neben der massiven Zerstörung von Geweben moduliert *C. perfringens* über das  $\alpha$ -Toxin auch die Immunantwort des Wirtes zu seinem Vorteil (Stevens et al., 1988; Stevens et al., 1997). Die Phospholipase C generiert Diacylglycerol, wodurch Proteinkinase C aktiviert wird. Diese aktiviert zelluläre Phospholipasen  $A_2$ , wodurch Arachidonsäure aus der *sn*-2 Position der Wirtsmembranen abgespalten wird. Dies führt zu der Stimulation der Thrombozytenaggregation. Der Blutfluß und damit die Sauerstoffversorgung der umliegenden Gewebe wird herabgesetzt (Bunting et al., 1997; Fujii

und Sakurai, 1989). Weiterhin werden Neutrophile angelockt, die aber nicht in das Gewebe einwandern, sondern in den Blutgefäßen verbleiben und die Blutgefäße schädigen (Bryant und Stevens, 1996; Titball, 2005). So schafft sich *C. perfringens* die für seine Replikation und Ausbreitung ideale anoxische Umgebung und eine lokale Suppression des Immunsystems.

Eine weitere gut untersuchte Phospholipase ist das über das T3SS in die Wirtszelle sekretierte ExoU-Protein von *Pseudomonas aeruginosa* (Frank, 1997). Besonders in Patienten, die durch Cystische Fibrose geschwächt sind, kann *P. aeruginosa* eine schwerwiegende Pneumonie auslösen (O'Malley, 2009). ExoU ist eine „Patatin-ähnliche“ PLA/LPLA, die im eukaryotischen Wirt stark zytolytisch ist (Sato et al., 2003). Die Phospholipase kann direkt Arachidonsäure aus der Wirtsmembran freisetzen, wodurch die Entzündungsreaktion verstärkt wird (Saliba et al., 2005). Die Gefäßwände erweitern sich, die Bakterien gelangen in das umgebene Gewebe und in das Blutgefäßsystem und können sich so effektiv ausbreiten. Weiterhin generiert ExoU Lysophosphatidylcholin, welches den wirtseigenen MAPK Signalweg eingeschaltet, welcher zu verstärkter Interleukin-8 Ausschüttung führt (Fang et al., 1997). Die überschießende Immunreaktion führt zu einer Schwächung des Wirtes und zu einer verstärkten Ausbreitung der Bakterien.

#### **1.11.1 Phospholipasen in *Legionella***

*Legionella pneumophila* besitzt mehrere verschiedene Phospholipase- und Lysophospholipaseaktivitäten (Tabelle 1.2). Besonders Phospholipasen A scheinen bei *Legionella* eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor einzunehmen, da sie in der Lage sind, den Lungensurfactant zu zerstören (Flieger et al., 2000). Durch Abspaltung einer freien Fettsäure von Diacylphosphatidylcholin entsteht das zytotoxische Lysophosphatidylcholin, welches durch die LPLA Aktivität wieder detoxifiziert werden kann (Flieger et al., 2000; Flieger et al., 2002).

**Tabelle 1.2: Phospholipase A Aktivitäten in *L. pneumophila***

Familie	Protein	Größe [kD]	enzymatische Aktivität	Signal- peptid	Lokalisation	Sekretion	Referenz
GDSL	PlaA	34,5	PLA, LPLA	Ja	sekretiert	Typ II <i>Isp</i>	(Flieger et al., 2001; Flieger et al., 2002)
	PlaC	49,8	PLA, LPLA, GCAT	Ja	sekretiert	Typ II <i>Isp</i>	(Banerji et al., 2005)
	PlaD	59,6	PLA, LPLA	Nein	sekretiert	?	(Rastew et al., unpublished)
PlaB	PlaB	53,7	PLA, LPLA	Nein	zellassoziiert	?	(Flieger et al., 2004)
Patatin- like	PatA/VipD	69,3	PLA, LPLA	Nein	sekretiert	Typ IVB <i>dot/icm</i>	(Banerji und Flieger, 2004)
	PatB	41,6	?	Ja		?	
	PatC/VpdA	75,6	?	Nein		Typ IVB <i>dot/icm</i>	
	PatD	43,7	?	Nein		?	(Aurass et al., 2009)
	PatE	39,4	?	Nein		?	
	PatF/VpdC	101,6	?	Nein		?	
	PatG/VpdB	66,3	?	Nein		Typ IVB <i>dot/icm</i>	
	PatH	31,9	?	Nein		?	
	PatI	40,6	?	Nein		?	
	PatJ	44,6	?	Ja		?	
	PatK	45,5	?	Nein		?	

### 1.11.1.1 Das PlaB-Protein

Das 53,7 kD große PlaB-Protein (Phospholipase A Gen B) von *L. pneumophila* Corby hat 474 Aminosäuren und kann aufgrund seiner Sequenz keiner der bisher bekannten Phospholipase A Familien zugeordnet werden. PlaB besitzt ein Lipasemotiv, wobei aber statt der üblichen Abfolge (GX SXG) das erste Glycin gegen ein Tyrosin ersetzt ist. *In silico* Analysen sagen für PlaB kein N-terminales Signalpeptid voraus. (Flieger et al., 2004). Die Proteinsequenz zeigt die größte Homologie zu Phospholipasen aus *Psychromonas ingrahamii*, *Mariprofundus ferrooxydans*, *Desulfuromonas acetoxidans* und *Shewanella sp.*. Dabei sind die Ähnlichkeiten auf die N-terminale Hälfte des Proteins beschränkt (Altschul et al., 1997).

PlaB ist die vorherrschende zell-assoziierte Phospholipase A von *L. pneumophila*. Darüber hinaus zeigt sie Lysophospholipaseaktivität und eine kontaktabhängige hämolytische Aktivität (Flieger et al., 2004).

## 1.12 Genregulation von hydrolytischen Enzymen in *L. pneumophila*

Der Übergang von der replikativen zur transmissiven Phase wird in *Legionella* über ein komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert, das nur teilweise erforscht ist. Das RNA-bindende Protein „carbon storage regulator A“ (CsrA) reprimiert in der replikativen Phase die Gene der transmissiven Phase. Bei Nährstoffmangel steuert das Zweikomponentensystem LetA/LetS die Inaktivierung von CsrA, wodurch die Gene der transmissiven Phase transkribiert werden können (Fettes et al., 2001; Hammer et al., 2002; Molofsky und Swanson, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass das LetA/S System durch den  $\sigma$ -Faktor RpoS gesteuert wird (Hovel-Miner et al., 2009). RpoS-Mutanten haben einen Replikationsdefekt in Protozoen. Obwohl sie ein funktionierendes *dot/icm* T4BSS besitzen, werden viele *dot/icm*-Substrate nicht exprimiert. Weiterhin hat RpoS Einfluss auf zahlreiche weitere Transkriptionsregulatoren wie FliA, RpoE, CpxR oder FleQ und kann daher als wichtiger Regulator der Genregulation in *Legionella* bezeichnet werden (Hovel-Miner et al., 2009).

Die Genexpression zahlreicher hydrolytischer Aktivitäten von *Legionella pneumophila* scheint ebenfalls durch das Zweikomponentensystem LetA/S und den alternativen  $\sigma$ -Faktor RpoS beeinflusst zu werden. *rpoS* und *letA* Mutanten zeigen eine stark reduzierte sekretierte Phospholipase A, Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase (GCAT), Protease, Phosphatase und p-NPPC Hydrolase Aktivität. Ebenso ist in diesen Mutanten die zell-assoziierte Phospholipase A und Lysophospholipase Aktivität vermindert. Dagegen ist die sekretierte Lysophospholipase und Lipase Aktivität in der spät-exponentiellen Phase stark erhöht. Die zell-assoziierte Phosphatase zeigt eine leicht erhöhte Aktivität (Broich et al., 2006).

### 1.13 Ziele der Arbeit

*L. pneumophila* ist ein aquatischer Umweltkeim, der sich in Amöben vermehren kann. Gelangen die Bakterien über kontaminierte Aerosole in die menschliche Lunge, so nutzen sie die zur Kolonisierung von Amöben erworbenen Mechanismen und replizieren in den Alveolarmakrophagen. Besonders bei älteren und immungeschwächten Personen kann dies zu einer Pneumonie führen, die mit einer hohen Mortalität verbunden ist, der Legionärskrankheit.

Kürzlich wurde in *L. pneumophila* das PlaB-Protein als die prominenteste zell-assoziierte Phospholipase A/Lysophospholipase A (PLA/LPLA) mit zusätzlicher hämolytischer Aktivität beschrieben (Flieger et al., 2004). Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion und Lokalisation des PlaB-Proteins zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Expression und Aktivität des PlaB-Proteins detailliert untersucht werden. Dazu sollte zunächst *in silico* gezeigt werden, wie konserviert das Gen in *L. pneumophila*- als auch in non-*pneumophila* Stämmen vorliegt und in welcher genomischen Umgebung das *plaB*-Gen eingebettet ist. Durch die Bestimmung des Transkriptionsstartes sollte die Promotorregion des *plaB*-Gens identifiziert werden. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt das PlaB-Protein eine Rolle im Lebenszyklus von *L. pneumophila* spielt, sollten sowohl die Genexpression als auch die hämolytische und PLA/LPLA Aktivität über die Wachstumsphasen hinweg untersucht werden.

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, das PlaB-Protein in *L. pneumophila* zu lokalisieren. Dazu sollten eine *plaB*-knock-out Mutante und polyklonale, gegen PlaB gerichtete Antikörper, hergestellt werden. Weitere Studien mit *Legionella*-Sekretionsmutanten sollten Aufschluss über die Sekretion des Proteins geben.

Im abschließenden Teil sollte eine mögliche Virulenzassoziation des PlaB-Proteins untersucht werden. Dazu sollten zunächst Studien zur Verbreitung von PlaB in verschiedenen *Legionella*-Isolaten sowie in noch nicht sequenzierten Stämmen durchgeführt werden. Avirulente Legionellen können mitunter besser auf stark salzhaltigen Nährböden wachsen, als virulente Stämme. Daher sollte die Salzresistenz der PlaB-Mutante im Vergleich zum Wildtyp überprüft werden.

Schließlich sollte eine mögliche Virulenzassoziation des PlaB-Proteins im natürlichen Wirt *Acanthamoeba castellanii* und auch im Meerschweinchenmodell überprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Omega$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ 15, $\Delta$ ( <i>argF lac</i> ), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rk <sup>-</sup> , mk <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1</i> $\lambda$ -	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS p199C	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cm <sup>r</sup> ] mit N-terminaler PlaB-Fusion in pCAL-n	(Heuner, Würzburg, 2005)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS p199D	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cm <sup>r</sup> ] mit C-terminaler PlaB-Fusion in pCAL-c. Zur Eliminierung der PlaB internen <i>NcoI</i> Schnittstelle musste ein Basenaustausch (C19T) mit Veränderung der Aminosäuresequenz vorgenommen werden (His7Tyr)	(Heuner, Würzburg, 2005)
<i>L. bozemanii</i> #131	Patientenisolat	(ATCC 33217)
<i>L. erythra</i> #132		(Saunders et al., 1992)
<i>L. hackeliae</i> Sg 1 #133	Patientenisolat	(ATCC 35250)
<i>L. longbeacheae</i> Sg1 #134	Patientenisolat	(ATCC 33462)
<i>L. lythica</i> #153	wächst bei 30°C	(Drozansky, Lublin, Polen)
<i>L. micdadei</i> L01-500 #230	Patientenisolat	(Lück, Dresden)
<i>L. micdadei</i> W02-539 #231	Wasserisolat	(Lück, Dresden)
<i>L. pneumophila</i> Corby	Patientenisolat	(Jepras et al., 1985)

## Sg 1 #70 (LpC)

LpC (pBCKS)	Wildtyp mit Leervektor, Cm <sup>r</sup>	(Flieger et al., 2004)
<i>L. pneumophila</i> Corby #143	Patientenisolat	(Jepras et al., 1985)
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I #145	Patientenisolat, passagiert durch Meerschweinchen	(ATCC 33152)
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I JR32 (JR32)	Restriktionsdefizientes Derivat von <i>L.p.</i> Phill (Sm <sup>r</sup> ), Laborstamm	(Marra und Shuman, 1989)
<i>L. pneumophila</i> 18398/98 #139	Patientenisolat	(Lück, Dresden)
LLAP10 #148	wächst bei 30°C	(CDC, Atlanta, USA)
LpC (pKH192)	PlaB Überexpression, Cm <sup>r</sup>	(Flieger et al., 2004)
LpC <i>plaB1</i>	Insertionsmutante, Km <sup>r</sup>	(Flieger et al., 2004)
LpC <i>plaB1</i> (pBCKS)	Insertionsmutante, Km <sup>r</sup> mit Leervektor	(Flieger et al., 2004)
LpC <i>plaB1</i> (pKH192)	Komplementation der Insertionsmutante, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(Flieger et al., 2004)
LpC <i>plaB1</i> (pJB04)	Komplementation der Insertionsmutante, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(Bender et al., 2009)
LpC <i>plaB::Km</i> K1, K5	knock-out Mutante, Km <sup>r</sup> , Klon 1 und 5	(diese Arbeit)
LpC <i>plaB::Km</i> (pKH192)	Komplementante zur knock-out Mutante Klon 1, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(diese Arbeit)
LpC <i>flaA</i> -Mutante	Flagellin-Mutante, Km <sup>r</sup>	(diese Arbeit)
LpC <i>lspDE</i> -Mutante	T2SS-Mutante, Km <sup>r</sup>	(Flieger, Berlin)
LpC <i>lssB</i> -Mutante K6	T1SS-Mutante, Km <sup>r</sup>	(Heuner, Würzburg)
LpC <i>mip</i> -Mutante	Mip-Mutante, Km <sup>r</sup>	(Wintermeyer et al., 1995)
LpC <i>tatC</i> -Mutante	Tat-Sekretionsmutante, Km <sup>r</sup>	(Lammertyn, Louvain, Belgien)
JR32 LELA3118 <i>dotA</i> -Mutante	T4BSS-Mutante, Km <sup>r</sup>	(Segal und Shuman, 1999)
JR32 Msp-Mutante	Msp-Mutante ( <i>proA</i> -codiert), Km <sup>r</sup>	(Szeto und Shuman, 1990)

---



### 2.1.2 Infektionsmodelle

**Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Infektionsmodelle**

Bezeichnung	Herkunft/ Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	(ATCC 30234)
Hartley Meerschweinchen (männlich, 300 g)	(Japan SLC Inc. Shizuoka, Japan; Charles River, Sulzfeld)

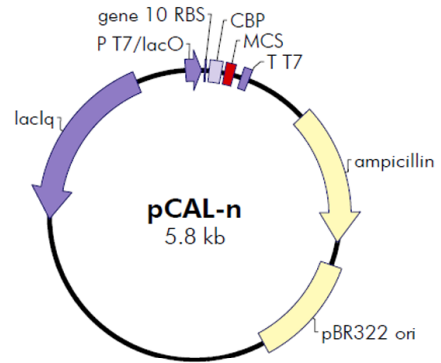
### 2.1.3 Vektoren

**Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren**

Vektor	Charakteristika	Herkunft
pBCKS	Cm <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> -Gen, T3- und T7-Promotor, ColE1, ori; Derivat von pUC19	Stratagene, Heidelberg
pCAL-c	Amp <sup>r</sup> , T7-Promotor, <i>lacZ</i> -Gen, Derivat von pET-11d, 4 kD „tag“ zur Klonierung von C-terminalen CBP-Fusionsproteinen	Stratagene, Heidelberg
pCAL-n	Amp <sup>r</sup> , T7-Promotor, <i>lacZ</i> -Gen, Derivat von pET-11a, 4 kD „tag“ zur Klonierung von N-terminalen CBP-Fusionsproteinen	Stratagene, Heidelberg
pGEMTeasy	Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> -Gen, T7-Promotor	Promega, Mannheim

### 2.1.3.1 Vektorkarte pCAL-n

**T7 promoter with lac operator** 1–44  
**T7 gene 10 RBS** 74–80  
**calmodulin-binding peptide (CBP)** 92–169  
**thrombin target** 170–187  
**multiple cloning site** 182–229  
**T7 terminator** 299–350  
**ampicillin resistance (bla) ORF** 762–1619  
**pBR322 origin** 1770–2437  
**lacI<sup>q</sup> repressor ORF** 4317–5396



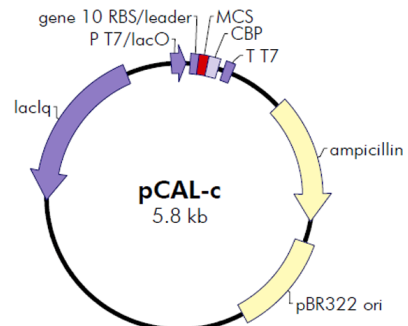
**pCAL-n Multiple Cloning Site Region**  
 sequence shown (86–232)

Nde I  
 CAT ATG AAG CGA CGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC CGC TTT AAG AAA  
 M K R R W K K N F I A V S A A N R F K K  
 START  
 calmodulin-binding peptide  
 thrombin cleavage  
 BamHI SmaI EcoRI  
 ...ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CTA GAC...  
 I S S S G A L L V P R G S P G I L D  
 thrombin target  
 NcoI SalI XhoI SacI HindIII  
 ...TCC ATG GGT CGA CTC GAG CTC AAG CTT AGA  
 S M G R L E L K L R

Abb. 2.1 Vektorkarte von pCAL-n (Stratagene)

### 2.1.3.2 Vektorkarte pCAL-c

**T7 promoter with lac operator** 1–44  
**T7 gene 10 RBS/leader** 74–120  
**multiple cloning site** 86–151  
**thrombin target** 128–145  
**calmodulin-binding peptide (CBP)** 152–229  
**T7 terminator** 299–350  
**ampicillin resistance (bla) ORF** 762–1619  
**pBR322 origin** 1770–2437  
**lacI<sup>q</sup> repressor ORF** 4317–5396



**pCAL-c Multiple Cloning Site Region**  
 sequence shown (86–232)

NcoI NheI BamHI  
 CC ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT C GGA TCC ATG TAT CCA CGT GGG AAT...  
 M A S M T G G Q Q M G \* G S M Y P R G N  
 START  
 T7 gene 10 leader peptide  
 thrombin cleavage  
 KpnI  
 ...GGT ACC AAG CGA CGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC CGC TTT...  
 G T K R R W K K N F I A V S A A N R F  
 calmodulin-binding peptide  
 ...AAG AAA ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT TGA  
 K K I S S S G A L STOP

\* ATG is not in frame with the C-terminal fusion tags.

Abb. 2.2 Vektorkarte von pCAL-c (Stratagene).

2.1.3.3 Vektorkarte pBCKS+

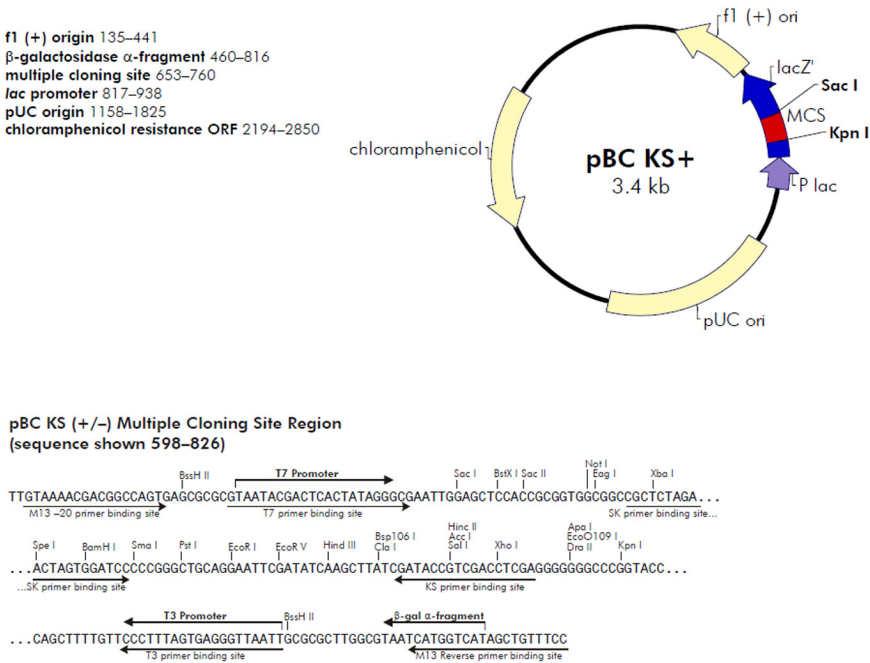


Abb. 2.3 Vektorkarte von pBCKS+ (Stratagene)

2.1.3.4 Vektorkarte pGEMTeasy

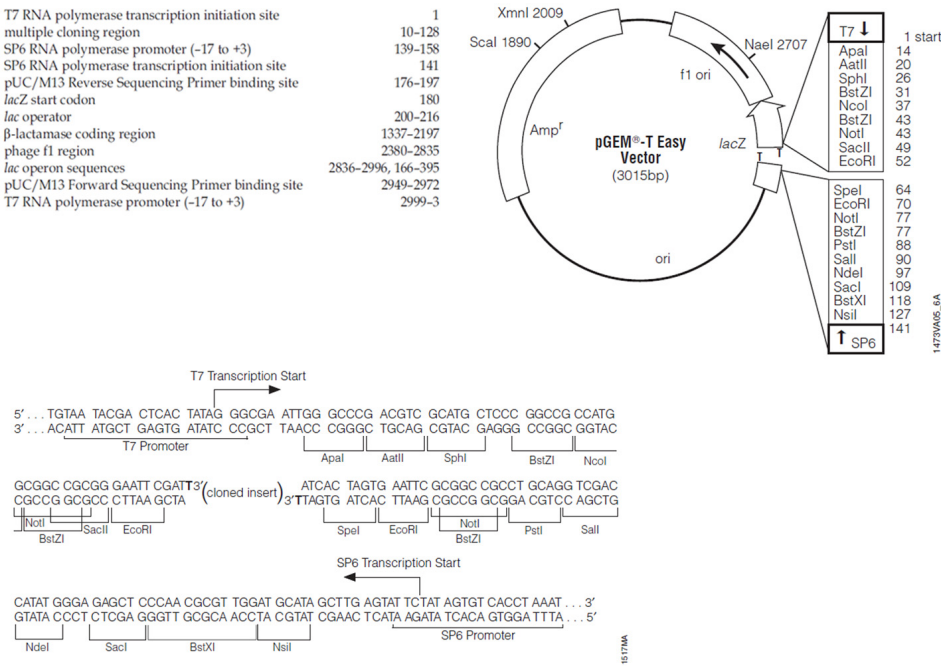


Abb. 2.4 Vektorkarte von pGEMTeasy (Promega)

### 2.1.4 Rekombinante Plasmide

**Tabelle 2.4: In dieser Arbeit zum Klonieren verwendete rekombinante Plasmide**

Bezeichnung	Vektor	Charakteristika	Referenz
pChA12	pGEMTeasy	Km <sup>r</sup> -Kassette; amplifiziert mit Km <sup>r</sup> -XbaI-U und Km <sup>r</sup> -XbaI-R; Insert: 1400 bp, kann mit <i>XbaI</i> ausgeschnitten werden	(C. Albert-Weissenberger)
pES1	pGEMTeasy	<i>plaB</i> mit je 500 bp flankierenden Sequenzen, amplifiziert mit Primern PlaB-500-U und R; Insert: 499+1425+499 = 2423 bp	(diese Arbeit)
pES2	pGEMTeasy	je 500 bp flankierende Sequenzen von <i>plaB</i> , amplifiziert mit PlaB-Inv-U und PlaB-Mut-XbaI2-R; Insert: 496+499= 995 bp	(diese Arbeit)
pES3	pGEMTeasy	Je 500 bp flankierende Sequenzen von <i>plaB</i> mit Km <sup>r</sup> -Kassette; Insert: 496+1400+499 = 2395 bp	(diese Arbeit)
pKH192	pBCKS	<i>plaB</i> , IPTG-induzierbar orientiert, Punktmutation A302G; führt nicht zur Reduktion der enzymatischen Aktivität	(Flieger et al., 2004)
pJB04	pBCKS	<i>plaB</i> -Gen, in pBCKS kloniert über <i>EagI</i> und <i>Sall</i>	(Bender et al., 2009)

### 2.1.5 Oligonukleotide

**Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz (5'-3')
PlaB-500-U	60	GAATTAAACAGTTCAACACGCATGG
PlaB-500-R	60	GATTTAGCGATGGCAGTTTTGGTAT
PlaB-Inv-U	60	TACCTCTTTCGTTTGATGCATT
PlaB-Mut-XbaI2-R	59,3	GCTCTAGAAATCGTTGTCTCACAA
PlaB Mut Ko-U	60,6	CCTTGAGCATACTGAGCAGAACT
Km <sup>r</sup> -XbaI-U	65,5	TGAATGTCAGCTTCTAGACTATCTGGACAAG
Km <sup>r</sup> -XbaI-R	72,2	GCGGCCATCGTGTCTAGACACTCCTGGAGT
M13-U	52,8	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	54,5	GGAAACAGCTATGACCATG
PlaB-F	57,1	ATGATTGTTATCTTCGTCCATGG
PlaB-R	55,9	GTAGGAGTTCACTGCATCATA
RpoN-F	55,9	TGGTCAACATCTCACGTTAAC
RpoN-R	55,9	CCTAGCAACTCAATGTCTTCA
FlaA-F	55,9	CATGATGCAAACATCGATCCA
FlaA-R	57,9	CTGCTACTTCTGTTTCCTGTTG
RACE1	57,3	CCAGTTGGCTTTCCACTGAT
RACE2	59,3	CCACCTTCCATAATATCGTAGTCA
RACE3	57,9	CAGGTAGAACTCCAAATGCCA
pUC18-U	62,7	GGTTTTCCCAGTCAGGACGTTGTA
pUC18-R	57,9	GTGGAATTGTGAGCGGATAAC

## 2.1.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem, Darmstadt; Becton Dickinson, Heidelberg; Biorad, München; Dianova, Hamburg; Fermentas, St. Leon-Rot; GE Healthcare/Amersham Biosciences, München; Gerbu, Gaiberg; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Oxoid, Wesel; Promega, Mannheim; Qiagen, Hilden; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, München, Thermo Scientific, Bonn; VWR International, Nürnberg.

## 2.1.7 DNA- und Proteingrößenstandards

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA- und Proteingrößenstandards wurden von Fermentas bezogen (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

### 2.1.7.1 DNA-Größenstandards

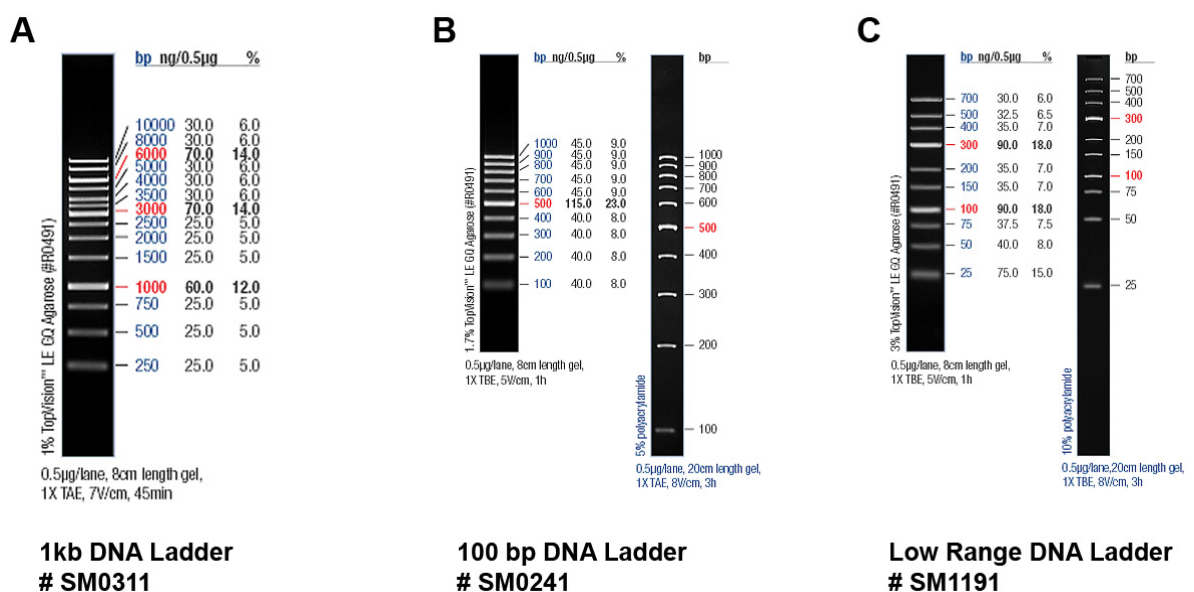


Abb. 2.5 Größenstandards zur Analyse von DNA Fragmenten in Agarosegelen (Fermentas). (A) 1 kb DNA-Größenstandard, (B) 100 bp DNA-Größenstandard, (C) Low range DNA-Größenmarker. Aufzutragen sind 8 µl.

### 2.1.7.2 Protein-Größenstandards

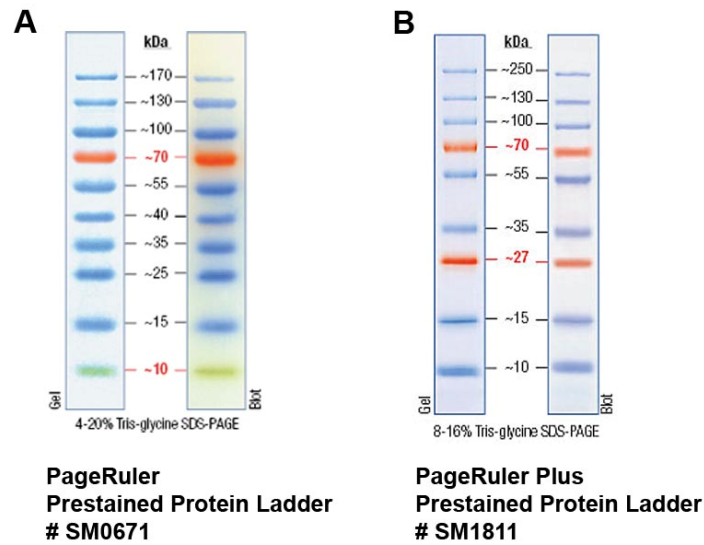


Abb. 2.6 Proteingrößenstandards zur Analyse von denaturierten Proteinen in Coomassiegelen (4  $\mu$ l aufzutragen) oder Western Blots (3  $\mu$ l aufzutragen) (Fermentas).

### 2.1.8 Antibiotika und Medienzusätze

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika. Die Lagerung erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

	Lösungsmittel	für <i>Legionella</i> [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]		für <i>E. coli</i> [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	
		Medium	Nährböden	Medium	Nährböden
Ampicillin					
(100 mg/ml)	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	-----	-----	100	100
Chloramphenicol			20 (10 nach		
(40 mg/ ml)	Ethanol	8	Elektroporation)	40	40
Kanamycin					
(40 mg/ ml)	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	8	12,5	40	40

weitere Zusätze in LB-Nährböden:

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete LB-Nährbodenzusätze. Die Lagerung erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aufgrund des Lösemittels Dimethylformamid sollte X-Gal in Glas- oder Polypropylengefäßen und lichtgeschützt gelagert werden.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Konz.
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	100 mM
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	Dimethylformamid	2% (w/v)

### 2.1.9 Antikörper

**Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Antikörper. Die Lagerung erfolgt bei -20°C. Verbrauchsmengen können bei 4°C aufbewahrt werden.**

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle	Referenz
$\alpha$ -Momp	Primärantikörper aus der Maus gegen <i>L. pneumophila</i> OmpM	Monofluo $\alpha$ - <i>Legionella</i> staining reagent Kit; Biorad, München	(Helbig et al., 2007; High et al., 1993)
$\alpha$ -DotA	Primärantikörper aus der Maus gegen <i>L. pneumophila</i> DotA	Reinhard Marre, Universität Ulm	(Roy und Isberg, 1997; Vincent et al., 2006)
$\alpha$ -Mip (2D8)	Primärantikörper aus der Maus gegen <i>L. pneumophila</i> Mip	M. Steinert, TU Braunschweig	(Helbig et al., 1995)
$\alpha$ -PlaB1	Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen das 15-mer 5'-GRIKSFFEGIEPGKC-3' aus <i>L. pneumophila</i> Corby PlaB	Genosphere, Paris, Frankreich	(Heuner, Würzburg)
$\alpha$ -PlaB2	Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen aufgereinigtes <i>L. pneumophila</i> PlaB	Seqlab, Göttingen	(diese Arbeit)
$\alpha$ -PlaB3	Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen die Peptide 5'-ENQSKQGKLDIQVGN-3' und 5'-QALAYYRLLDFHSSLADIHK-3' aus <i>L. pneumophila</i> Corby PlaB	Metabion AG, Planegg/Martinsried	(diese Arbeit)
Ziege $\alpha$ -Maus IgG	Sekundärantikörper, Meerettich-Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg #115-035-062	(diese Arbeit)
Ziege $\alpha$ -Maus IgG	Sekundärantikörper, Meerettich-Peroxidase konjugiert	Thermo Scientific, Bonn #31446	
Ziege $\alpha$ -Kaninchen IgG	Sekundärantikörper, Meerettich-Peroxidase konjugiert	Dianova, Hamburg #111-035-003	



### 2.1.10 Enzyme

**Tabelle 2.9: In dieser Arbeit verwendete Enzyme**

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
<i>XbaI</i>	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs/ Fermentas
Top-Taq	DNA-Polymerase	Qiagen
Go Taq	DNA-Polymerase	Promega
Taq	DNA-Polymerase	Invitex
REDTaq Ready Mix	PCR Mix	Sigma-Aldrich
Klenow- Enzym	Untereinheit der DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs/Fermentas

### 2.1.11 Verwendete Kits

**Tabelle 2.10: In dieser Arbeit verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Plasmid Mini Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
5'/3'RACE Kit	Roche
One Step RT PCR	Qiagen
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche

## 2.1.12 Geräte

**Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete Geräte**

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
Autoklav	Fedegari Autklavi
Brutschränke (30°C und 37°C)	Heraeus electricons, CO <sub>2</sub> belüftet
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektroporator	BioRad
Entwicklermaschine	Agfa, Curex 60
Feinwaage	Chyo JL-180
Gel Dokumentationsanlage	BioRad Gel Doc 2000
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg Öko
Gefrierschrank (-80°C)	nunc
Graphitblotter	peqlab Biotechnologie GmbH
Grobwaage	Kern 470
Heizblock	Liebisch
Homogenisator	ULTRA-TURRAX T25, IKA-Labortechnik
Kühlschrank	Privileg Öko
Kühlzentrifuge	Heraeus, Multifuge 1 L-R
Magnetrührer	GLW M21
Nano Drop Spectrophotometer ND 1000	peqlab Biotechnologie GmbH
Netzgeräte	Biorad
PCR-Gerät	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW Multiline P4
Photometer	Amersham Bioscience Ultraspec 3100 pro
Pipetten	Eppendorf
Proteingelapparatur	BioRad Mini – Protean III Electrophoresis Cell
Schüttler	Certomat BS-1
Sterilwerkbank	Nunc Microflow
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Heraeus-Biofuge
Ultraschallgerät	Bandelin Sonolpus HD70
Vortexer	Vortex Genie 2
Wasserbad	GFL

## 2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich Angaben in der Einheit [rpm] auf die Zentrifugation in Tischzentrifugen.

### 2.2.1 Kultivierungstechniken

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde auf LB-Nährböden oder in LB-Flüssigmedium für 1 Tag bei 37°C kultiviert.

##### LB- Nährböden

12 g Agar

10 g Bacto Trypton

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen und autoklavieren

##### LB- Flüssigmedium

10 g Bacto Trypton

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen und autoklavieren

Bei Bedarf wurden die Medien und Nährböden durch Antibiotika und weitere Zusätze supplementiert (siehe 2.1.8).

### 2.2.1.2 Kultivierung von *Legionella*

*Legionella pneumophila* stellt komplexe Wachstumsanforderungen und wurde daher auf BCYE-Nährböden für 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> oder in YEB-Flüssigmedium über Nacht unter Schütteln bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die im Medium enthaltene Hefe dient als Nährstoff, ACES puffert das Medium und die Aktivkohle inaktiviert toxische Sauerstoffradikale. L-Cystein dient als Energie- und Kohlenstoffquelle. Weiterhin macht diese Aminosäure die Aufnahme von Eisen möglich, da es dreiwertige Eisenverbindungen in ihre transportierbare, zweiwertige Form überführt.

#### BCYE-Nährböden

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen und den pH-Wert mit 10N KOH auf pH 6,9 einstellen, dann Zugabe von:

2 g Aktivkohle

15 g Agar

Lösung autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen lassen, vor dem Gießen der Platten Zugabe von sterilfiltriertem

0,4 g L-Cystein in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

0,25 g Fe<sup>III</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

### YEB-Flüssigmedium

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  lösen und den pH-Wert mit 10N KOH auf pH 6,9 einstellen, dann Zugabe von:

0,4 g L-Cystein in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

0,25 g  $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$  in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Lösung in autoklavierte Flasche sterilfiltrieren (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße)

Bei Bedarf wurden die Medien und Nährböden durch Antibiotika supplementiert (siehe 2.1.8).

#### **2.2.1.3 Kultivierung von *A. castellanii***

*A. castellanii* wurde in 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen kultiviert (Nunc EasYFlasks™ #156367, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Die Inkubation fand bei Raumtemperatur statt.

### PYG-Wachstumsmedium

20 g Proteose Pepton

1 g Hefe-Extrakt

1 g  $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

10ml 0,4M  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

10ml 0,25M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

10ml 0,25M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8ml 0,05M  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

ad 940 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Nach dem Autoklavieren wurde sterilfiltriert hinzu gegeben:

10 ml 0,005M  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

50 ml 2M Glucose

Die Amöben wurden jeden vierten Tag passagiert, wobei jeweils 1 ml der vom Boden abgeklopften und resuspendierten Zellen eine Flasche mit 9 ml frischem PYG-Medium überführt wurden. Die Infektion von *A. castellanii* mit *Legionella* ist unter 2.2.5.1 beschrieben.

#### **2.2.1.4 Konservierung von Bakterien**

Die Bakterien wurden mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in Cryo-Röhrchen mit 500 µl 20%igem Glycerin resuspendiert. So ist eine dauerhafte Lagerung bei -80°C möglich.

### **2.2.2 Nukleinsäure-Techniken**

#### **2.2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA**

Die Gesamt-RNA wurde aus *Legionella pneumophila* Corby Flüssigkulturen der OD<sub>600</sub>=1 gewonnen. Die Isolation erfolgte gemäß der Anleitung mit dem „High Pure RNA isolation kit“ (Roche, Mannheim). Darauf folgte ein weiterer DNase I Verdau (Qiagen, Hilden) mit anschließender Aufreinigung über das „RNeasy mini kit“ (Qiagen, Hilden). Der vollständige Verdau der DNA wurde über eine Kontroll-PCR mit den Primern RpoN-F/R und chromosomaler DNA von *Legionella pneumophila* Corby überprüft. Die Qualität der isolierten RNA wurde mit dem Nanodrop 1000 Gerät überprüft, während die genaue RNA Konzentration mit einem Photometer bestimmt wurde.

#### **2.2.2.2 Isolation von chromosomaler DNA**

Zur Isolation der chromosomalen DNA wurde auf Nährböden kultivierte Bakterien mit 3 ml Lösung I abgeschwemmt und für 6 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung II resuspendiert und mit 60 µl 250 mM EDTA pH 8 versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min und 37°C unter leichtem Schütteln. Nach Zugabe von 40 µl 250 mM EDTA pH 8 und 48 µl 10% SDS wurde der Ansatz für weitere 15 min bei Raumtemperatur

geschüttelt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 625 µl TES-Puffer pH 8 und 6 µl Proteinase K (10 mg/ ml) während 1 h bei 37°C verdaut. Zum Entfernen der Proteine wurden 250 µl 5 M NaClO<sub>4</sub> und 250 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in Schräglage geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min wurde eine Phasentrennung erreicht und die obere, DNA haltige, Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Waschschrift mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNA durch Zugabe von 3 Volumenteilen eiskaltem absolutem Ethanol für 1 h bei -20°C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min pelletiert und in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen. Die chromosomale DNA wurde bei 4° C gelagert.

#### Lösung I

0,15 M NaCl

0,1 M EDTA (pH 8)

#### Lösung II

1 M Saccharose

10 mM Tris/HCl (pH 8)

#### TES-Puffer

30 mM Tris/HCl (pH 7,5)

5 mM EDTA (pH 7,5)

5 mM NaCl

### **2.2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA**

3 ml einer Kultur mit exponentiell gewachsenen Bakterien wurden für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl Lösung I versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II erfolgte die Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurden 150 µl Lösung III zugegeben und der Ansatz erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 8 min bei 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch eine Phenol/ Chloroform Extraktion mit anschließender DNA-

Fällung gereinigt. Das Plasmid-DNA Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Alternativ wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers zur Plasmidisolation benutzt.

#### **2.2.2.4 Phenol-Chloroform Extraktion**

Zur Entfernung von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit ½ Volumen Phenol und ½ Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gevortext. Durch Zentrifugation für 8 min bei 14000 rpm bildeten sich drei Phasen. Die untere Phase sowie die weiße Interphase enthielten die Proteine und wurden verworfen. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Chloroform/ Isoamylalkohol versetzt, gevortext und für 8 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Waschschrift wiederholt. Schließlich konnte die DNA aus dem gereinigten Überstand ausgefällt werden.

#### **2.2.2.5 DNA Fällung**

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/ 10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung und 3 Volumenteilen eiskalten absoluten Ethanol versetzt und für 20 min bei -70°C oder für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das getrocknete Pellet in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.



#### 2.2.2.6 Restriktionsverdau

Zum Verdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs nach Herstellerangaben verwendet.

##### Restriktionsansatz Doppelverdau

x µl DNA (ca. 1 µg)

5 µl 10x NEB-Puffer

1 µl Enzym 1

1 µl Enzym 2

ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Enzyme für 15 min bei 65°C inaktiviert.

#### 2.2.2.7 *DpnI* Verdau

In *E. coli* DH5α amplifizierte DNA liegt methyliert vor, wogegen durch PCR amplifizierte DNA nicht methyliert ist. Die Restriktionsendonuklease *DpnI* bindet spezifisch an methylierte DNA und verdaut somit in einem PCR-Produkt nur die eingesetzte *E. coli* DNA.

##### Restriktionsansatz *DpnI* Verdau

42 µl PCR Produkt

5 µl NEB-Puffer 4

3 µl *DpnI*

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37°C. Eine Inaktivierung ist nicht nötig, wenn sich dem Verdau eine Gelelution anschließt oder der Ansatz eingefroren wird. Ansonsten wurde das Enzym für 15 min bei 65°C inaktiviert.

#### **2.2.2.8 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA**

Diese Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA verhindert die Religation des Vektors ohne Insert.

##### Dephosphorylierungsreaktion

x µl DNA (1-5 µg)

2 µl Antarctic Phosphatase Puffer (10x)

1 µl Antarctic Phosphatase (5U)

ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Dephosphorylierung fand für 1 h bei 37°C statt. Die Hitzeinaktivierung wurde für 5 min bei 65°C durchgeführt.

#### **2.2.2.9 Klenow-Reaktion**

Das Klenow-Enzym ist die große Untereinheit der DNA Polymerase I. Daher kann es 5' Überhänge auffüllen und besitzt 3'-5' Exonucleaseaktivität. Die 5'-3' Exonukleaseaktivität ist in der kleinen Untereinheit der DNA-Polymerase lokalisiert und fehlt daher im Klenow-Enzym. Die Reaktion wurde für 30 min bei RT durchgeführt, um stumpfe DNA-Enden zu erzeugen.

##### Klenow-Reaktion

2 µl Enzym

5 µl NEB-Puffer 2 (10x)

1 µl Desoxyribonukleotide (20 mM)

20 µl PCR-Produkt

ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Inaktivierung wurde mit Phenol durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz mit 1 Volumenteil Phenol versetzt und gevortext. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 Volumenteil Chloroform-

Isoamylalkohol (24:1) und erneutes Vortexen. Durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm erfolgte eine Phasentrennung. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde zu dem Überstand 1 Volumenteil Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat gegeben und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA gefällt und in 71 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen (siehe 2.2.2.5).

#### **2.2.2.10 Religation**

Die Religation wurde mit dem Produkt aus der inversen PCR durchgeführt, welches durch Klenow-Verdau stumpfe Enden aufwies. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt.

##### Religation

71 µl PCR-Produkt

1 µl T4 DNA-Ligase

8 µl T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)

ad 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Inaktivierung erfolgte bei 65°C für 10 min. Anschließend wurde die DNA gefällt (siehe 2.2.2.5).

#### **2.2.2.11 Ligation von DNA mit dem pGEMTeasy Ligationskit**

Der Vektor pGEMTeasy aus dem Kit ist bereits linearisiert und hat 5' T-Überhänge. PCR-Produkte, die mit einer taq-Polymerase amplifiziert wurden, besitzen 3' A-Überhänge. Daher ist die direkte Ligation des gefällten DNA-PCR-Produktes in den Vektor möglich und wurde folgendermaßen durchgeführt:

#### pGEMTeasy Ligation

x µl PCR-Produkt (300 ng)  
y µl pGEMTeasy Vektor (100 ng)  
2 µl Teasy Ligase  
10 µl Teasy Puffer (2x)

ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Ligation erfolgte in einem 16°C Wasserbad über Nacht. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz für 10 min in den 65°C Heizblock gestellt. Anschließend erfolgte eine DNA-Fällung und die Aufnahme der DNA in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

Der Vektor pGEMTeasy trägt eine Ampicillinresistenz und ist daher für die Transformation in die natürlicherweise ampicillinresistenten Legionellen nicht sinnvoll.

#### **2.2.2.12 Ligation von DNA mit T4 Ligase**

Zum Einbringen von DNA in *Legionella* wurde der Vektor pBCKS benutzt, da dieser eine Cholramphenicolresistenz trägt.

#### T4 Ligation

x µl PCR-Produkt (300 ng)  
y µl pBCKS Vektor (100 ng)  
2 µl T4 Ligase  
2 µl Teasy Puffer (10x)

ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Die Ligation erfolgte in einem 16°C Wasserbad über Nacht. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz für 10 min in den 65°C Heizblock gestellt. Anschließend erfolgte eine DNA-Fällung und die Aufnahme der DNA in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

### 2.2.2.13 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml exponentieller ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 (ca. 4 h) inkubiert.

Die Bakterien wurden für 10 min bei 4000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Im Folgenden wurde das Pellet dreimal mit eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500 µl eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen und je 80 µl in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Bakterien wurden bis zur Elektroporation bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung kompetenter Legionellen wurden 100 µl einer *Legionella* Vorkultur der OD<sub>600</sub>=1,5–2 auf BCYE-Nährboden ausplattiert und für 24 h kultiviert. Die Legionellen wurden mit eiskaltem 10%igem Glycerin abgeschwemmt und ebenso wie für *E. coli* beschrieben kompetent gemacht.

### 2.2.2.14 Transformation durch Elektroporation

Ein Aliquot kompetenter Bakterien (siehe 2.2.2.13) wurde auf Eis angetaut und dann in eine auf Eis stehende, vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad, München) überführt. Nach Zugabe von 5 µl Plasmid-DNA (siehe 2.2.2.11 oder 2.2.2.12) erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) bei 100 Ω, 25 µF. Für die Transformation von *E. coli* wurden 1,7 kV angelegt, für *Legionella* betrug die Spannung 2,3 kV. Der Zeitwert sollte 2- 2,5 msec betragen. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien sofort in 1 ml vorgewärmtes Medium ohne Antibiotikum übertragen und für 12 h in YEB-Medium (*Legionella*), bzw. für 1 h in LB-Medium (*E. coli*) bei 37° C inkubiert.

Die Bakterien wurden auf Nährböden mit Antibiotika angezüchtet, um auf Bakterien zu selektionieren, die das Plasmid enthielten. Die Nährböden für *E. coli* Transformanden enthielten zusätzlich X-Gal und IPTG, wobei die resultierenden weißen Klone den Vektor mit dem Insert enthielten. Die erfolgreiche Transformation der Bakterien wurde in einer „Aufkoch-PCR“ (siehe 2.2.2.18) mit den M13 Primern überprüft, die die „multiple cloning site“ des Vektors mit dem enthaltenen Insert amplifizieren.

### 2.2.2.15 Natürliche Transformation von *Legionella*

*Legionella* ist in der Lage DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Über homologe Rekombination kann die DNA dann ins Chromosom integriert werden.

Es wurden 5 ml einer exponentiellen *Legionella pneumophila* Corby Übernachtskultur für 10 min bei 4000 rpm pelletiert und 3 ml des Mediums verworfen. Die resuspendierte Kultur wurde in sterile Plastikröhrchen überführt. Dann erfolgte die Zugabe der aufgereinigten DNA aus 8 x 100 µl PCR-Reaktionsansätzen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 3 Tage ohne Schütteln. Die Transformanten wurden auf Selektivnährböden bei 37°C angezüchtet und mittels „Aufkoch-PCR“ überprüft (siehe 2.2.2.18).

### 2.2.2.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Amplifikation von chromosomaler DNA, Plasmid-DNA oder linearisierter doppelsträngiger DNA eingesetzt. Es wurden verschiedene taq-Polymerasen verwendet, wodurch sich die Protokolle unterschieden, nicht aber die PCR-Reaktion selbst.

Bei einer PCR-Reaktion wird zunächst der Doppelstrang der Ursprungs-DNA durch Hitzedenaturierung (~ 95°C) getrennt. Dann erfolgt die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge, was auch als „Annealing“ bezeichnet wird. Die Schmelztemperatur der Primer richtet sich nach ihrer Länge und dem GC-Gehalt. Die Schmelztemperatur kann folgendermaßen berechnet werden:

$$T_m = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$$

$T_m$  = Schmelztemperatur (in °C), A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

Im Folgenden verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3' Richtung („Elongation“). Eine taq-Polymerase benötigt je nach Hersteller und Produkt ungefähr 1 min zur Elongation von 1 kb DNA.

### PCR-Reaktion

1.	(Initiale Denaturierung):	94°C	1 min
2.	(Denaturierung):	94°C	1 min
3.	(Primer-Anlagerung):	50-60°C	1 min
4.	(Elongation):	72°C	1-6 min
5.	(abschließende Elongation):	72°C	5 min
6.	(Kühlung):	16°C	pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 29 Zyklen wiederholt, was zur exponentiellen Amplifikation der DNA führt.

### PCR mit TopTaq-Polymerase (Qiagen)

x µl DNA (ca 0,5 µg)  
 5 µl PCR-Puffer (10x)  
 10 µl Q-Puffer  
 0,25 µl Primer U (100 pmol/µl)  
 0,25 µl Primer R (100 pmol/µl)  
 1 µl dNTP's (10mM)  
 0,5 µl TopTaq- Polymerase (5U/µl)  
  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### PCR mit goTaq-Polymerase (Promega)

x µl DNA (ca 0,5 µg)  
 10 µl goTaq-Flexi-Puffer (10x)  
 5 µl MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 µl Primer U (100 pmol/µl)  
 0,5 µl Primer R (100 pmol/µl)  
 0,5 µl dNTP's (10mM)  
 0,25 µl taq- Polymerase (5U/µl)  
  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### PCR mit taq-Polymerase (Invitex)

x µl DNA (ca 0,5 µg)  
5 µl Puffer (10x)  
3 µl MgCl<sub>2</sub>  
0,25 µl Primer U (100 pmol/µl)  
0,25 µl Primer R (100 pmol/µl)  
1 µl dNTP's (10mM)  
0,3 µl taq- Polymerase (5U/µl)

ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

PCR mit RedTaq-PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich)

x µl DNA (ca 0,5 µg)  
25 µl PCR Reaction Mix  
0,5 µl Primer U (100 pmol/µl)  
0,5 µl Primer R (100 pmol/µl)

ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**2.2.2.17 Inverse PCR**

Inverse PCR

1 µl Plasmid-DNA  
10 µl PCR-Puffer (10x)  
20 µl Q-Puffer (aus dem TopTaq Qiagen Kit)  
0,5 µl Primer PlaB-Inv-U (100 pmol/µl)  
0,5 µl Primer PlaB-Mut-XbaI2-R (100 pmol/µl)  
1 µl Desoxyribonucleotide (10mM)  
1 µl taq- Polymerase (5U/µl)  
66 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>



Inverse PCR-Reaktion

1.	(Initiale Denaturierung):	94°C	1 min
2.	(Denaturierung):	94°C	1 min
3.	(Primer-Anlagerung):	53°C	1 min
4.	(Elongation):	72°C	1-6 min
5.	(abschließende Elongation):	72°C	5 min
6.	(Kühlung):	16°C	pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 29 Zyklen wiederholt.

**2.2.2.18 PCR mit ganzen Bakterien („Aufkoch-PCR“)**

Die Aufkoch-PCR diente zum Testen von bakteriellen Einzelkolonien. Dazu wurde  $H_2O_{dd}$  in PCR Reaktionsgefäße vorgelegt und etwas Bakterienmaterial mit einem sterilen Zahnstocher von der Nährbodenplatte überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren für die PCR benötigten Komponenten. Der initiale Denaturierungsschritt wurde auf 7 min erhöht, um die Bakterien aufzuschließen und die DNA für die PCR zugänglich zu machen.

**2.2.2.19 Sequenzierungs-PCR**

Zur Sequenzierung von DNA wurde eine PCR mit dem „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden DNA-Mengen eingesetzt:

PCR-Produkte (100-200 bp)	1-3 ng
PCR-Produkte (200-500 bp)	3-10 ng
PCR-Produkte (500-200 bp)	10-20 ng
Plasmide	150-300 ng

### Reaktionsansatz

x µl DNA (in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>)

0,5 µl Primer (10 pmol/µl)

1 µl BigDye 3.1 Mix

1,5 µl 5x Puffer

ad 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (HPLC-Qualität)

### Sequenzierungs-PCR-Reaktion

1.	(Initiale Denaturierung):	96°C	2 min
2.	(Denaturierung):	94°C	10 sec
3.	(Primer-Anlagerung):	45-60°C	10 sec
4.	(Elongation):	60°C	4 min
5.	(Kühlung):	4°C	pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt.

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in der Sequenzierungsabteilung des Robert Koch-Institutes durch Gelfiltration aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzauswertung erfolgte durch das „BioEdit sequence alignment editor and analysis“ Programm der Version 7.0.9.0.

### **2.2.2.20 Reverse Transcription (RT)-PCR**

Für die RT-PCR mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) wurden 5 ng Gesamt-RNA, je 3µM Primer, je 400 µM dNTPs, 5 × OneStep RT-PCR buffer mit 12,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 µl OneStep RT-PCR enzyme mix in einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Neben den Primern PlaB-F/R dienten die Primer RpoN-F/R und FlaA-F/R zur Kontrolle der Reaktion. Die Amplifikation erfolgte nach einem Aktivierungsschritt für die Reverse Transkriptase (50°C, 30 min) nach dem folgenden Programm: 94°C für 1 min, 51°C für 1 min, 72°C für 1 min mit 24-25 Zyklen in einem Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen).

**2.2.2.21 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese**

Für die horizontale Gelelektrophorese wurden 500 ml TAE-Puffer mit 0,9% Agarose aufgekocht und unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt. Das Gel wurde in die Gießvorrichtung der Flachgelapparatur (Biorad, München) gegossen und die Kämme eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Laufkammer mit TAE Puffer eingesetzt und die Kämme entfernt. Die DNA-Proben wurden in DNA-Puffer resuspendiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Größe wurden stets 8 µl DNA Größenmarker in die erste Tasche aufgetragen (siehe 2.1.7). Die Elektrophoresekammer wurde so an eine Stromquelle angeschlossen, dass die negativ geladene DNA von der Kathode zur negativ geladenen Anode entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V bis zur ausreichenden Auftrennung der DNA. Zur Visualisierung wurde das Agarosegel für ca. 15 min in ein Ethidiumbromidbad (100 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) gelegt und anschließend in einer Geldokumentationsapparatur unter UV-Licht fotografiert.

DNA-Puffer (10x)

8% SDS

40% Glycerin

20% β-Mercaptoethanol

0,008% Bromphenolblau

0,25 M Tris/HCl pH 6,8

50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>**2.2.2.22 Gelelution von DNA-Fragmenten durch Kälte-Phenol-Extraktion**

Die gewünschten DNA Banden wurden unter UV Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Reaktionsgefäßen mit einem Glasstab zerstampft. Nach Zugabe von 400 µl Phenol

wurde das Gemisch gründlich gevortext und für 1 h bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen und erneutem Vortexen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat und ½ Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Das Gemisch wurde für 2 min gevortext und anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß die DNA gefällt (siehe 2.2.2.5).

#### **2.2.2.23 Bestimmung des Transkriptionsstarts von *plaB* (RACE Methode)**

Die RACE Methode (rapid amplification of cDNA ends) (5'/3' RACE Kit, Roche) wurde verwendet, um das 5'Ende der *plaB* mRNA zu amplifizieren und damit den Transkriptionsstart des *plaB*-Gens zu bestimmen. Zunächst wurde aus exponentiell gewachsenen Flüssigkulturen von *Legionella pneumophila* Corby die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.2.1). Das RACE-Kit wurde nach Protokoll des Herstellers verwendet. Zur Kontrolle wurde den Reaktionsansätzen die im Kit enthaltene RNA zugesetzt und nach jedem Reaktionsschritt 1 µl für eine spätere Kontroll-PCR entnommen. Die Synthese der cDNA erfolgte mit 3 µg RNA und dem spezifischen Primer RACE1. Die RNase H Aktivität der reversen Transkriptase führte zum Verdau der eingesetzten RNA. Die cDNA wurde mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) nach dem im 5'/3'RACE Kit beiliegendem Protokoll aufgereinigt. Mit einer terminalen Transferase wurde ein Poly-A-Schwanz an das 3' Ende der cDNA angehängt, um eine Amplifikation des 5' Endes durchführen zu können. Die PCR erfolgte mit dem im Kit enthaltenen Oligo(dT)-Anker Primer und dem spezifischen Primer RACE3 nach dem angegebenen PCR-Protokoll bei einer Annealing-Temperatur von 55°C. Da die Transkriptionsrate von *plaB* schwach war, wurde eine zweite PCR durchgeführt, wobei statt dem Primer RACE2 der Primer RACE3 verwendet wurde. Eine PCR mit im Kit enthaltenen Primern und je 1 µl cDNA, aufgereinigte cDNA und Poly(A) cDNA ermöglichte die Überprüfung der Reaktionsschritte der in den Ansätzen enthaltenen Kontroll-RNA. Schließlich wurden die Produkte der Kontroll-PCR's in einem 2%-igen Agarosegel mit dem 100 bp DNA Größenmarker (Fermentas) und die Produkte der *plaB*-Amplifikations-PCR's in einem 0,9% igen Agarosegel mit dem 1 kb DNA-Größenmarker (Fermentas) analysiert. Das Produkt aus der PCR mit dem RACE3 Primer wurde mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) nach dem im Kit beiliegendem Protokoll aufgereinigt und mit dem Primer RACE3 direkt sequenziert.

#### 2.2.2.24 Herstellung der LpC *plaB*::Km knock-out Mutante

Im ersten Schritt wurde das zu mutierende Gen mit flankierenden Bereichen von je 500 bp über die Primer PlaB-500-U und PlaB-500-R amplifiziert. Um die DNA aufzukonzentrieren und Salze zu entfernen wurde die DNA gefällt (siehe 2.2.2.5) und in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen. Es folgte die Ligation in den Vektor pGEMTeasy (siehe 2.2.2.11). Das Plasmid wurde durch Elektroporation in *E. coli* DH5α eingebracht (siehe 2.2.2.14) und in einer Plasmidisolation reisoliert (siehe 2.2.2.3). Der pGEMTeasy Vektor mit *plaB* und den 500 bp flankierenden Bereichen wurde mit pES1 bezeichnet. Dieses Plasmid wurde in der folgenden inversen PCR mit den Primern PlaB-Inv-U und dem die *Xba*I Schnittstelle erzeugenden Primer PlaB-Mut-XbaI2-R verwendet. Dabei wurden 2 x 100 µl PCR Ansätze verwendet. Zur Aufreinigung wurde das QIAQuick PCR Aufreinigungskit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte der 2 x 100 µl Ansätze wurden auf eine Säule aufgetragen und in 42 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert. Um das Plasmid aus dem Ansatz zu entfernen, wurde ein *Dpn*I Verdau durchgeführt. *Dpn*I verdaut nur methylierte DNA und damit das in *E. coli* DH5α amplifizierte Plasmid, nicht aber die PCR-Produkte. Die Ansätze wurden in einem 0,9%-igem Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit dem PCR-Produkt wurde aus dem Gel eluiert (siehe 2.2.2.22) und einem Klenow-Verdau unterzogen (siehe 2.2.2.9). Darauf folgte die Religation (siehe 2.2.2.10) und die Amplifikation des Plasmids in *E. coli* DH5α (siehe 2.2.2.14 und 2.2.2.3). Zum Einbringen der Kanamycinkassette in das Plasmid wurde ein *Xba*I-Restriktionsverdau mit der Kassette und dem Plasmid durchgeführt (siehe 2.2.2.6). Die Enden des linearisierten Plasmids wurden dephosphoryliert (siehe 2.2.2.8). Danach erfolgte die Ligation (siehe 2.2.2.12) und Amplifikation des Plasmids in *E. coli* DH5α (siehe 2.2.2.14 und 2.2.2.3). Schließlich wurde das Plasmid in einem 800 µl PCR Ansatz mit den Primern PlaB-500-U und PlaB-500-R zur Amplifikation der Kanamycinkassette mit den 500 bp flankierenden chromosomalen Regionen von PlaB verwendet (siehe 2.2.2.16). Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAQuick PCR Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt und über natürliche Transformation in *Legionella* eingebracht (siehe 2.2.2.15). Die homologe Rekombination und damit der Austausch des PlaB Gens durch die Kanamycinkassette wurde durch Aufkoch-PCR (siehe 2.2.2.18) mit den Primerpaaren PlaB-F/PlaB-R und PlaB-Mut-Ko-U/ Km-Xba-U überprüft.

### 2.2.3 Proteinchemische Methoden

#### 2.2.3.1 Überexpression von PlaB mit CBP-„tag“

Zur Überexpression des PlaB-Proteins lagen bereits die Stämme *E. coli* BL21 (DE) pLysS mit den Vektoren p199C bzw. 199D vor. In Plasmid 199C ist das PlaB-Protein N-terminal mit einer Calmodulinbindedomäne auf dem Vektor pCAL-n fusioniert. Plasmid 199D bezeichnet die C-terminale Fusion mit der Calmodulinbindedomäne auf dem Vektor pCAL-c.

Zur Überexpression des PlaB-Proteins wurden 2 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt und mit *E. coli* p199C oder *E. coli* p199D angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 geschüttelt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden geerntet und in 2 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde vollständig zum Animpfen von 50 ml LB-Medium mit oben genannten Antibiotika in einem 250 ml Kolben verwendet. Die Flüssigkultur wurde erneut bei 37°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 erreicht war. Nach der Entnahme einer Probe von 1 ml als uninduzierte Kontrolle wurde der Kultur IPTG in der finalen Konzentration von 2 mM zugegeben und so die Genexpression induziert. Nach 2,5 Stunden weiteren Wachstums wurden die Bakterien für 5 min auf Eis gestellt und dann durch die Zentrifugation bei 5000 x g für 5 min bei 4°C geerntet. Zur Kontrolle der Induktion wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung des Gels mit je 10 µl der induzierten und nicht induzierten Proben durchgeführt.

#### 2.2.3.2 Aufreinigung von PlaB über Calmodulinsäulen

Die Aufreinigung der Calmodulinbindeprotein-PlaB Fusionsproteine (CBP-PlaB) wurde über Calmodulin-Säulen durchgeführt. Die bakteriellen Pellets wurden zunächst 1:5 (w/v) in CaCl<sub>2</sub> Bindepuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über Ultraschall (Branson Sonifier, 3x 45 sec, 65% Intensität, 4 Zyklen).

Das Calmodulin wurde wie folgt äquilibriert: Der Lagerungspuffer auf dem Calmodulin wurde abgeschüttet und das Calmodulin in 5 Volumenteilen CaCl<sub>2</sub> Bindepuffer resuspendiert. Nach dem Absetzen des Calmodulins wurde der Überstand erneut abgeschüttet und mit 5 Volumenteilen CaCl<sub>2</sub> Bindepuffer vermischt. Nach erneutem Absetzen wurde das Calmodulin in 1 Volumen CaCl<sub>2</sub> Bindepuffer aufgenommen.

Die Säule wurde wie folgt aufgebaut: Eine Einweg-Plastiksäule (BD Biosciences, Heidelberg) wurde zu 1/10 mit  $\text{CaCl}_2$  Bindepuffer beladen, um Luftblasen zu eliminieren. Dann wurde das äquilibrierte Calmodulin an einem Glasstab entlang in die Säule gefüllt und mit  $\text{CaCl}_2$  Bindepuffer bedeckt. Schließlich wurde das Bakterienlysate auf die Säule geladen, der Säulenauslauf geöffnet und die Säule mit 10 Säulenvolumen  $\text{CaCl}_2$  Bindepuffer gewaschen. Bei neutralem pH-Wert und dem Vorhandensein von Calcium bindet das PlaB-Protein über seinen Calmodulinbindeprotein-,tag“ an das Calmodulin in der Säule.

Die Elution der an das Calmodulin gebundenen Proteine erfolgte durch Waschen der Säule mit Elutionspuffer. Das im Puffer enthaltene EDTA komplexiert das Calcium und das CBP-PlaB-Protein wird nicht mehr von dem Calmodulin gebunden.

Die Säule wurde durch Waschen mit 3 Volumenteilen 1 M NaCl/2 mM EDTA regeneriert.

#### $\text{CaCl}_2$ Bindepuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

150 mM NaCl

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

1 mM Magnesiumacetat

1 mM Imidazol

2 mM  $\text{CaCl}_2$

#### Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

2 mM EDTA

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.2.3.3 Detektion von CBP-PlaB über den „tag“

Nach einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot wurde die CBP-PlaB Detektion mit einem Detektionskit (Affinity CBP Fusion Protein Detection Kit, #200370, Stratagene, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend von der unter 2.2.3.7 beschriebenen Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen erfolgten die Waschschrte zweimal für 5 min mit TBSC-T-Puffer und anschließend einmal mit TBSC-Puffer. Zu Inkubation des Primärantikörpers mit der Membran wurden 3 µl bio-CaM in 1 ml TBSC-Puffer resuspendiert und auf eine Plastikfolie pipettiert. Die Membran wurde mit der Vorderseite auf die Lösung gelegt und der Blot luftblasenfrei mit der Folie eingepackt. Die Inkubation erfolgte unter einem Reaktionsgefäßhalter für 30 min bei Raumtemperatur. Der Streptavidin-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 für 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt.

Zur Farbentwicklung wurde der Blot in 20 ml Entwicklungspuffer mit 80 µl NBT und 60 µl BCIP gelegt. Die Reaktion wurde durch Übertragen der Membran in Stopp-Lösung beendet.

#### TBSC-Puffer

20 mM Tris/HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

1 mM CaCl<sub>2</sub>

#### TBSC-T-Puffer

TBSC

0,05% Tween 20 (v/v)

#### Farbentwickungs-Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 9,5)

100 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub> (nach Autoklavieren der Lösung sterilfiltriert zugeben)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

#### Stopp-Lösung

20 mM Tris/HCl (pH 2,9)

1 mM CaCl<sub>2</sub>



#### 2.2.3.4 Präadsorption von Antikörpern

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Präadsorption von polyklonalen PlaB-Antikörpern gegen das Lysat der *plaB*-Mutante durchgeführt. Die gewachsenen Bakterien von 3 Nährbodenplatten wurden mit 3 ml TBS abgeschwemmt. Die Zellwand wurde durch die Zugabe von 10 µl Lysozym (50 mg/ml) und die Inkubation für 10 min bei 37°C zerstört. Die anschließende Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 3x 45 sec, 65% Intensität, 4 Zyklen) führte zur Lyse der Bakterien. Das Lysat wurde in 10 ml TBS aufgenommen und unter leichtem Schütteln 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS gewaschen. Daraufhin konnte der Antikörper in einer 1:10 Verdünnung in TBS für 1 h 30 min auf der Membran inkubiert werden. Da die Membran mit Proteinen aus der PlaB-Mutante abgesättigt war, sollten alle nicht PlaB-spezifischen Antikörper binden. Die Antikörperlösung wurde für den Western Blot verwendet.

#### 10 x TBS-Puffer (pH 7,6)

76,5 g NaCl

54 g Tris/HCl

ad 900 ml, der pH-Wert wurde auf pH 7,6 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

#### 2.2.3.5 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate“ – Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden die Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken und führt somit zur Auflösung der Tertiärstruktur des Proteins. SDS ist ein Anion, bildet Komplexe mit den Proteinen aus der Probe und denaturiert diese. Die stark negative Ladung des Komplexes ist in etwa proportional zu der Masse des Proteins und die ursprüngliche Ladung des Proteins kann dadurch vernachlässigt werden. Nachdem das elektrische Feld angelegt worden ist, wandern die SDS-Protein-Komplexe unterschiedlich schnell durch die Poren des Gels in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Größe der einzelnen Proteine lässt sich im Vergleich zu dem mitgelaufenen Proteingrößenmarker ermitteln.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde eine Mini-Protean Tetracell Kammer (Biorad, München) mit zugehörigem Gelgießstand verwendet. Die Glasplatten wurden mit 100% Ethanol gereinigt und in den Gelgießstand eingebaut. Der Zwischenraum der Glasplatten wurde zu 2/3 mit dem flüssigen Trenngel befüllt und mit 70% Ethanol überschichtet um eine gerade, luftblasenfreie Trennschicht herzustellen.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Ethanol abgeschüttet, der verbleibende Zwischenraum mit Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm eingesteckt. Das polymerisierte Gel wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingespannt. Bei dem Befüllen der äußeren Kammer mit SDS-Laufpuffer wurde darauf geachtet, dass am unteren Rand des Gels keine Luftblasen entstehen, da sonst der Stromfluss behindert wird. Die Kammer zwischen den Glasplatten muss bis knapp unter den Rand mit SDS-Laufpuffer befüllt werden, damit der Stromkreis geschlossen wird.

Die aufzutrennenden Proben wurden in 4 x Rotiload-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen, für 5 min bei 100°C aufgeköcht und anschließend in die durch den Kamm entstandenen Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V für ca. 1,5 h bis zum Herauslaufen der Lauffront.

Die Gesamtproteine wurden durch Coomassiefärbung visualisiert. Zur spezifischen Detektion von Proteinen über Antikörper wurde das SDS-Gel für einen Western Blot eingesetzt.

#### 10 x SDS-Laufpuffer

30g Tris/HCl

144,4 g Glycin

10g SDS

auf 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen

Rezept für zwei Acrylamidgele 12%**Tabelle 2.12: Rezept für zwei SDS-Minigele (Biorad-Gelkammern)**

	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
30% Acrylamid/ Bis-Lösung (Rotiphorese Gel A, Roth, Karlsruhe)	4,8 ml	1,33 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4,2 ml	4,4 ml
Tris-Puffer	3 ml (1,5M, pH 8,8)	2 ml (0,5M, pH 6,8)
10% SDS	120 µl	80 µl
10% APS (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	60 µl	40 µl
TEMED <sup>1</sup>	7,5 µl	5 µl

<sup>1</sup>TEMED darf erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben werden, da diese Substanz zum Polymerisieren des Acrylamids führt.

**2.2.3.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

Die Detektionsgrenze einer Coomassiefärbung liegt bei etwa  $\geq 1 \mu\text{g}$  Protein. Die SDS-Gele wurden für mindestens 1 h unter leichtem Schütteln in Coomassielösung inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte entweder mit Entfärberlösung oder durch wiederholtes Erhitzen und mehrere Waschschrte mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in der Mikrowelle.

Coomassie-Lösung

454 ml 96% Ethanol

92 ml Eisessig

2,5 g Coomassie-Blue R250

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Entfärber

100 ml Isopropanol

100 ml Eisessig

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Zu dauerhaften Konservierung wurde das Gel für 30 min in „Gel drying solution“ (#161-0752, Biorad, München) dehydriert, in mit „Gel drying solution“ getränkter Cellophanfolie eingepackt und ihn einem Rahmen für einen Tag getrocknet.

#### 2.2.3.7 Western Blot („semi-dry“ Verfahren)

Die durch eine SDS-Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) übertragen, um spezifische Proteine über Antikörpern zu detektieren. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 1-10 ng Protein.

Eine auf die Größe des Gels zugeschnittene NC-Membran und sechs Whatmanpapiere wurden mit Towbinpuffer getränkt. Der Blot wurde auf der mit Towbinpuffer angefeuchteten Anodenplatte des Semi-Dry-Blotters aufgebaut. Auf drei Lagen Whatmanpapier wurde die NC-Membran, darüber das Gel und schließlich drei weitere Lagen Whatmanpapier geschichtet. Das Gel darf nach dem Auflegen auf die Membran nicht verrutscht werden, da der Proteintransfer unmittelbar nach dem Auflegen beginnt. Mit einer Glaskapillare und geringem Druck wurde über den Blot gerollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen. Die Blotkammer wurde durch Auflegen der ebenfalls mit Towbinpuffer angefeuchteten Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer wurde für 1 h 15 min bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in TBS/5% Milch für 1 h blockiert, einmal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen und für 1 h mit dem in TBS/1% Milch verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem ebenfalls in TBS/1% Milch verdünnten Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper. Auf die zwei finalen Waschschriffe folgte die Inkubation der Membran mit einem 10:1 Gemisch der ECL Entwicklerlösung (GE Healthcare, München) und der Millipore Advanced Entwicklerlösung (Millipore, Schwalbach) für 1 min. Die überschüssige Lösung wurde abgegossen und die Membran in Frischhaltefolie eingepackt. Die in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegten Röntgenfilme wurden in einer Agfa Curix 60 Maschine (Agfa, Berlin) entwickelt. Die Merrettichperoxidase setzt das in den Lösungen enthaltende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> um. Der entstandene Sauerstoff oxidiert das enthaltene Luminol, was zur Abstrahlung von Licht führt.

Ist ein Signal zu stark für die Röntgenfilmdetektion, so kann die Membran für 10 min in TBS-Puffer gewaschen und dann für die Farbreaktion verwendet werden.

Hierbei wurden die Proteine direkt auf der Membran durch Inkubation mit 3 ml 4-Chloro-1-naphthol und 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 47 ml TBS detektiert. Die Farbentwicklung wurde durch Austausch der Entwicklerlösung gegen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> abgestoppt.

#### Towbinpuffer

3 g Tris

14,4 g Glycin

20% Methanol

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

### **2.2.3.8 „Stripping“ von Nitrocellulose-Membranen**

Durch diese Methode können Antikörper wieder von der Nitrocellulose-Membran entfernt werden. Dadurch wird eine weitere Proteindetektion mit anderen Antikörpern möglich.

#### Stripping Puffer

10 g SDS 2% (w/v)

3,63 g 62,5 mM Tris/HCl (pH 7,6)

ad 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

unmittelbar vor Gebrauch werden zugegeben:

100 mM β-Mercaptoethanol

Die Membran wurde in einem Hybridisierungssofen für 30 min bei 55°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend 2 x für 10 min in TBS-Puffer gewaschen.

### 2.2.3.9 Anreicherungsfraktionierung

Diese Methode wurde angewandt, um die bakteriellen Membranen von Zytosol und Periplasma zu trennen und somit anzureichern. Exponentiell gewachsene Flüssigkulturen (20 ml) verschiedener *Legionella* Stämme wurden für 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert, um eventuelle Bakterienverunreinigungen zu entfernen. Der Überstand wurde mit 3 Volumenteilen Isopropanol versetzt, kräftig geschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 2000 x g und 4°C pellettiert und in 50 µl PBS pH 7,4 resuspendiert. Die Bakterienpellets wurden in 5 ml PBS pH 7,4 gelöst, durch Ultraschallbehandlung (3x45 sec, power cycle 90, power set 65%, Bandelin Sonoplus HD) aufgeschlossen und für 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Pellet mit den Membranen wurde in 50 µl PBS pH 7,4 gelöst der Überstand wurde wie für die Kulturüberstände gefällt und ebenfalls in 50 µl resuspendiert. Die so gewonnenen Proben wurden in den ausgestanzten Löchern der Humanblut-Platten (siehe 2.2.4.4) für 2 Tage bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3.10 Sucroседichtegradientenfraktionierung

Die Auftrennung der inneren und äußeren Membran von *Legionella pneumophila* Corby Wildtyp wurde nach Modifikation verschiedener beschriebener Protokolle durchgeführt (Hindahl und Iglewski, 1984; Osborn et al., 1972; Roy und Isberg, 1997). Es wurden je 500 ml *Legionella pneumophila* Corby Wildtyp und die PlaB-Mutante in YEB-Flüssigmedium bis zur OD<sub>600</sub>=1,0 angezogen und durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 min bei 4°C pellettiert. Das Pellet wurde einmal in 40 ml kaltem 10 mM HEPES pH 7,6 gewaschen und in 5 ml 25% Sucrose/10 mM HEPES pH 7,6 Puffer (w/w) aufgenommen. Des Weiteren wurden 50 µl DNase und RNase (10 mg/ml) zugegeben. Die Bakterien wurden durch eine einzige Passage in einer „french pressure cell“ bei geringem Druck (Einstellung „midi“, 600 psi) aufgeschlossen. Intakte Zellen wurden durch die Zentrifugation bei 1000 g für 15 min und 4°C pelletiert und verworfen. Die im Überstand enthaltenen Lysate wurden bis zu einer finalen Konzentration von 5 mM mit EDTA pH 8 versetzt. Die Sucroselösungen wurden in 10 mM HEPES pH 7,6 mit 5 mM EDTA pH 8 angesetzt. Durch Aufschichten von 0,4 ml 55% Sucroselösung (weight per weight) und je 2 ml der 50%, 45%, 40%, 35% Sucroselösung (weight per weight) in ultra-clear SW40 Zentrifugenröhrchen (Beckman, Krefeld) wurde ein Gradient hergestellt und mit 2 ml der Lysate überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei

36300 rpm für 20 h bei 4°C mit einem SW40 Ti Rotor in einer Beckman Ultrazentrifuge. Die Probengewinnung erfolgte durch Anstechen des Zentrifugenröhrchenbodens mit einer 20G Injektionsnadel und anschließendes Sammeln von Fraktionen zu je 500 µl. Zum Untersuchen der enzymatischen Aktivität wurden 75 µl jeder zweiten Fraktion auf Humanblut-Platten inkubiert bzw. im PLA-Assay eingesetzt.

Das major outer membrane protein MOMP (25 kD) und das DotA-Protein (113kD) wurden als Kontrolle für die korrekte Auftrennung der Membranen verwendet, da ihre Lokalisation in der äußeren bzw. inneren Membran bereits bekannt ist (Roy und Isberg, 1997; Vincent et al., 2006). Um diese Proteine zu detektieren, wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden 10 µl jeder zweiten Fraktion der Sucrosegredienten in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 6 µl Laemmli Puffer (Roti-load 1, Roth, Karlsruhe) resuspendiert. Die Proben, in denen später das MOMP-Protein nachgewiesen werden sollte, wurden für 5 min bei 100°C aufgeköcht. Dagegen wurden die Proben für die Detektion von DotA für 30 min auf Eis inkubiert. Für die Detektion von MOMP wurde der Antikörper aus dem Monofluo anti-*Legionella* staining reagent kit (Biorad, München) in der Verdünnung 1:100 in TBS/1% Milch verwendet. Der monoklonale Antikörper gegen DotA wurde in der Verdünnung 1:1000 in TBS/1% Milch eingesetzt. Der „horse raddish peroxidase“ (HRP) gekoppelte Ziege α-Maus Sekundärantikörper wurde in den Verdünnungen 1:5000 für MOMP und 1:10000 zur Detektion von DotA eingesetzt. Während die mit dem α-MOMP- Antikörper inkubierte Membran mit 4-Chloro-1-naphthol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt auf der Membran durchgeführt wurde, wurde das DotA-Protein auf einem Röntgenfilm detektiert.

### 2.2.3.11 Proteinase K Verdau

Flüssigkulturen von *Legionella pneumophila* Wildtyp, der *plaB*-Mutante und der Komplementante wurden in YEB-Medium bis zur OD<sub>600</sub>=1 angezogen, pelletiert und 1:2 verdünnt in PBS pH 7,4 gelöst. Der Versuch wurde in 96-Napf Platten durchgeführt. Dazu wurden 25 µl Bakterien mit Proteinase K in den Endkonzentrationen von 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml und 100 ng/ml für 15 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinase K Aktivität durch eine 10 minütige Inkubation mit Pefabloc SC (Roche, Mannheim) bei 37°C vollständig inhibiert. Die verbliebene membranständige Phospholipase A-Aktivität der intakten Bakterien wurde durch einen anschließenden PLA-Assay (2.2.4.2) gemessen.

10x PBS-Puffer (pH 7,4)

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml, der pH-Wert pH 7,6 wurde vor dem Autoklavieren eingestellt.

**2.2.4 Phänotypische Assays****2.2.4.1 Probengewinnung für wachstumsphasenspezifische Untersuchungen**

Um die Genexpression und die enzymatische Aktivität des PlaB-Proteins in verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen, wurde *L. pneumophila* Corby Wildtyp, die Mutante *L. pneumophila* Corby *plaB1* Mutante, die Komplementante *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) und der PlaB überexprimierende Stamm *Legionella pneumophila* Corby (pKH192) in YEB-Flüssigmedium angezogen. Da keiner der Stämme einen Replikationsdefekt aufweist, wurden die Proben für alle Stämme bei der gleichen OD<sub>600</sub> gewonnen. Dabei wurde OD<sub>600</sub>=0,7 als früh-exponentielle, OD<sub>600</sub>=1 als exponentielle, OD<sub>600</sub>=2 als spät-exponentielle und OD<sub>600</sub>=2,5 als stationäre Phase definiert. Zum Ernten wurden die Proben bei 4000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20mM Tris-Puffer PH 7,4 (oder PBS pH 7,4) gelöst. Zum Herstellen von Lysaten wurden die Proben mit Ultraschall (Branson Sonifier, 3x 45 sec, 65% Intensität, 4 Zyklen) behandelt.

**2.2.4.2 Phospholipase Aktivitätsassay (PLA-Assay)**

Die Phospholipase PlaB spaltet von dem Substrat 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Al., USA) freie Fettsäuren ab. Diese Hydrolyse kann mit dem in der Diagnostik zur Cholesterolverbestimmung verwendeten NEFA-C-kit (WAKO Chemicals, Neuss) photometrisch bestimmt werden.

Je 25 µl der Probe wurden in eine 96-Napf Mikrotiterplatte pipettiert. Das Substrat DPPC (Stockkonzentration 100 mg/ml Ethanol) wurde für 15 min bei 37°C geschüttelt und dann



unter Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 3 x 15 sec, 65% Intensität, 4 Zyklen) bis zu einer Endkonzentration von 6,7 mM in den Substratpuffer pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wurde in jeden Napf 25 µl DPPC/Substratpuffer pipettiert. Als Negativkontrolle wurden statt der Bakterienprobe 25 µl 20mM Tris-Puffer pH 7,5 verwendet. Die Abspaltung der freien Fettsäuren durch die bakterielle Aktivität erfolgte während der Inkubation von 3 h bei 37°C unter leichtem Schütteln mit 100 rpm. Zur Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren wurde die Platte bei 600 rpm 5 min zentrifugiert und danach je 10 µl des Inkubationsansatzes in eine neue 96-Napf Mikrotiterplatte überführt. Als Standard dienten 10 µl des im Kit enthaltenen Oleats. Nach Anleitung des Herstellers wurden die im NEFA-Kit bereitgestellten Chemikalien gelöst und 50 µl der Lösung 1 zu den 10 µl Probe gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wurden 100 µl der Lösung 2 hinzu gegeben und die Platte erneut 10 bei 37°C inkubiert. Der durch die freien Fettsäuren hervorgerufene Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Berechnung der freien Fettsäuren [mM] erfolgte unter Berücksichtigung des Leerwertes und des Standards Oleat nach der folgenden Formel:

$$\text{FFA [mM]} = \frac{\text{OD}_{550} (\text{Probe} - \text{Leerwert}) \times 28,2}{\text{OD}_{550} (\text{Standard})} \times 0,035$$

**Abbildung 2.1 Formel zur Berechnung der freien Fettsäuren. In der Formel verwendete Faktoren zur Berechnung der FFA in [mM]: 28,2 mg/dl = Konzentration des Standards Oleat, mg/dl x 0,035 = mmol/l**

#### Substrat-Puffer

20 mM Tris-Puffer pH 7,4

3 mM NaN<sub>3</sub>

0,5% (v/v) Triton-X 100)

#### **2.2.4.3 Flüssighämolyseassay**

Zur quantitativen Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden 0,5 ml humanes Erythrozytenkonzentrat für 10 min bei 2500 rpm und 4°C in 50 ml PBS pH 7,4 gewaschen, bis der Überstand farblos war. Für den Versuch wurde das Pellet in 40 ml PBS gelöst. Die Bakterien wurden mit einer Impföse von der Nährbodenplatte abgenommen, für 10 min bei 4000 rpm in PBS pH 7,4 gewaschen und mit PBS pH 7,4 auf die OD<sub>600</sub>=2 eingestellt. Zur Durchführung des Assays wurden 800 µl Erythrozyten-Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 2500 rpm für 3 min auf 200 µl Bakterien zentrifugiert. Als Negativkontrolle dienten 800 µl Erythrozyten mit 200 µl PBS pH 7,4. Zur Ermittlung des Wertes für die vollständige Hämolyse wurden einem Kontrollansatz 10 µl 10% SDS zugegeben. Die Proben wurden für 7 h bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch mehrmaliges Invertieren in Lösung gebracht und die Bakterien mit den intakten Erythrozyten durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 min pelletiert. Durch Hämolyse freigesetztes Hämoglobin färbte den Überstand rot. Die Färbung wurde durch eine Absorptionsmessung bei A<sub>415 nm</sub> quantitativ bestimmt. Dabei wurde die Negativkontrolle als Referenz eingesetzt, die Proben 1:4 und die SDS-Kontrolle 1:10 verdünnt gemessen.

#### **2.2.4.4 Hämolyseassay auf Humanblut-Platten**

Zur Herstellung von Humanblut-Platten wurden 0,9% Agarose in PBS pH 7,4 in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 40°C wurde 24% gewaschenes, humanes Erythrozytenkonzentrat zugegeben und die Flüssigkeit in eckige Petrischalen gegossen. In die erkalteten Blutplatten wurden mit umgekehrten Pipettenspitzen Löcher gestanzt. Um zu vermeiden, dass die Flüssigkeit durch die Löcher in die gesamte Platte läuft, wurde der Boden der Löcher mit einer dünnen Schicht der ausgestochenen Agarose wieder verschlossen. Die Proben wurden in die Löcher gefüllt und die Platten bei 37°C für 1-2 Tage inkubiert.

#### 2.2.4.5 Salz-Streßtest

Um die Salzresistenz von *Legionella* zu untersuchen wurden BCYE-Nährböden (siehe 2.2.1.2) mit Zusatz von 100 mM NaCl gegossen. Die Bakterien wurden in doppeltem Ansatz in 96-Napfplatten mit einer Multikanalpipette in PBS pH 7,4 verdünnt und 20 µl in verschiedenen Verdünnungsstufen jeweils auf einen BCYE-Nährboden mit und ohne NaCl aufgetropft. Die Platten wurden für 2 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und das Wachstum der Bakterien anschließend verglichen.

#### 2.2.4.6 Proteaseaktivität

Zur Überprüfung der Msp-Proteaseaktivität von *Legionella* wurden die Bakterien zunächst auf BCYE-Nährböden angezüchtet und dann mit einer Impföse auf Casein-Agar ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

##### Casein-Agar für *Legionella*

9 g Hefe-Extrakt

9 g Aces

1,4 g Stärke

9 g Casein (#C8654, Sigma-Aldrich, München)

ad 900 ml, pH-Wert wurde mit 10N KOH auf 6,9 eingestellt.

Danach wurde zugegeben:

13,5 g Agar

Lösung autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen lassen, vor dem Gießen der Platten Zugabe von sterilfiltriertem

0,4 g L-Cystein in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

0,25 g Fe<sup>III</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## 2.2.5 *In vivo* Experimente

### 2.2.5.1 Infektion von *Acanthamoeba castellanii*

Zur Infektion von *Acanthamoeba castellanii* mit *L. pneumophila* wurden die Amöben aus einer konfluent bewachsenen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturfalsche durch Klopfen der Flasche abgelöst und in ein 50ml Plastikröhrchen gegeben. Mit einer Zählkammer nach Neubauer wurde die Anzahl der Amöben in 100 µl der Suspension bestimmt. Die Amöben wurden durch Zentrifugation bei 800 rpm für 5 Minuten pelletiert und mit Infektionsmedium auf eine Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt. Zur Bestimmung der Replikationsrate der Bakterien nach 24 h, 48 h, 72 h im Doppelansatz wurden pro Bakterienstamm jeweils 6 Näpfe einer 24-Napfplatte mit je 1 ml Amöbensuspension befüllt. Zum Adhäreren der Amöben wurde die Platte für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die infizierenden Legionellen wurden zuvor für drei Tage in YEB-Nährmedium angezogen und mit Infektionsmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Die Bakterien wurden in Infektionsmedium bis auf 10<sup>-6</sup> Bakterien/ml verdünnt und je 1ml der Suspension zu den Amöben in der 24-Napfplatte gegeben (entspricht einer MOI von 0,01). Um den „0 h-Wert“ zu definieren, wurde das Bakterien-Inokulum auf BCYE-Nährböden ausplattiert und für drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die entsprechenden Proben aus den Näpfen in Reaktionsgefäße überführt, die Amöben durch Vortexen lysiert und der Ansatz schließlich ebenfalls auf BCYE-Nährböden ausplattiert und für drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Schließlich wurde Anzahl der auf den Nährböden gewachsenen Kolonien ausgezählt und so die CFU für jeden Tag der Infektion bestimmt.

#### Infektionsmedium

1 g Na<sub>3</sub>-Citrat

10 ml 0,4 M MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

10 ml 0,25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

10 ml 0,25M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8 ml 0,05M CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O

ad 980 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Nach dem Autoklavieren wurde sterilfiltriert hinzu gegeben:

10 ml 0,005M Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

### 2.2.5.2 Infektion von Meerschweinchen

Für den Infektionsversuch wurden männliche Hartley Meerschweinchen (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan und Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 300 g eingesetzt, die zuvor mehrere Tage in Quarantäne gehalten wurden.

Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) in Lunge und Milz wurden sechs Tiere mit *Legionella pneumophila* Corby Wildtyp infiziert und sieben Tiere mit der *PlaB1* Mutante. In einem zweiten Experiment wurden histologische Schnitte der infizierten Lungen angefertigt. Dazu wurden jeweils drei Tiere mit *Legionella pneumophila* Wildtyp, der *plaB1* Mutante und der *plaB* Komplementante infiziert.

Die Bakterien wurden aus Glycerinstocks auf BCYE-Nährböden ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für drei Tage inkubiert. Von diesen Platten wurden YEB-Flüssigkulturen angesetzt und die Bakterien in der exponentiellen Phase geerntet. Für die Infektion der Meerschweinchen wurden 1-3 x 10<sup>6</sup> Bakterien unter Narkose intratracheal injiziert.

Nach 48 h (für die CFU Bestimmung in Lunge und Milz) bzw. 40 h (für die Immunhistochemie) wurden die Tiere euthanasiert und die zu untersuchenden Organe entnommen. Zur Bestimmung der CFU wurden die Organe homogenisiert und in mehreren Verdünnungsstufen auf BCYE-Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert. Die Auszählung der Bakterienkolonien erfolgte nach Inkubation von 3 Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die CFU wurde angegeben als eine Ratio aus der Anzahl der Bakterien nach 2 Tagen Infektion/Anzahl der Bakterien im Inokulum.

Für die Immunhistochemie wurden dünne Schnitte aus definierten Bereichen der Lunge angefertigt und über Nacht in 4% gepufferter Formaldehydlösung pH 7,0 fixiert. Die anschließende Einbettung in Paraffin ermöglichte Dünnschnitte von 4 µm Schichtdicke. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin/Eosin gefärbt oder immunhistochemisch untersucht.

#### Hämatoxilin/Eosin-Färbung

Die Kontrastierung von Zell- und Gewebestrukturen mit Hämatoxilin und Eosin ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen. Hämatoxilin ist ein natürlicher basischer Farbstoff und wird in dieser Färbung als Hämalaun eingesetzt, um alle basophilen Strukturen blau anzufärben. So werden insbesondere die DNA und das raue endoplasmatische Retikulum blau gefärbt. Eosin färbt als ein saurer synthetischer saurer Farbstoff alle eosinophilen Strukturen rot, also vor allem zytoplasmatische Proteine. Erythrozyten erscheinen in dieser Färbung rot gefärbt.

**Immunhistochemie**

Die Färbungen wurden nach etablierten Methoden im Institut für Pathologie der Universität Würzburg durchgeführt (Schmausser et al., 2004). Dabei wurden die Gewebsschnitte zunächst deparaffinisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Zugabe von Casein-Lösung (Power Block Universal Blocking Reagent, Bio Genex, San Ramon, USA) abgesättigt. Darauf folgte die Inkubation mit den folgenden Antikörpern bei 4°C über Nacht:

Die Makrophagen wurden mit dem monoklonalen Maus Antikörper MAC387 (1:100) sichtbar gemacht, für die Detektion des Endothels wurde der monoklonale Maus Antikörper EN4 (1:50) benutzt und Legionellen wurden über den *Legionella pneumophila* Sg 1 Antikörper (1:100) detektiert. Im zweiten Schritt wurde das Biotin/Streptavidin-Peroxidase Detektionssystem (Super Sensitive Multilink HRP Detection System, Bio Genex) mit einer 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) Lösung als Substrat benutzt. Als Negativkontrolle diente eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper. Die Färbungen mit einem Zeiss Axioskop 40 Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analysen zur Expression und Aktivität von PlaB

##### 3.1.1 *In silico* Analysen

Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit waren die Genomsequenzen von *L. pneumophila* Corby (Glöckner et al., 2008), *L. pneumophila* Philadelphia I (Chien et al., 2004), *L. pneumophila* Lens (Cazalet et al., 2004), *L. pneumophila* Paris (Cazalet et al., 2004) und die PlaB Sequenz von *L. spiritensis* (GenBank: ABN58727) veröffentlicht. Die Sequenz von *L. micdadei*, *L. hackeliae* und LLAP10 wurden uns von G. Glöckner (Leibniz Institut für Altersforschung- Fritz-Lipman-Institut, Jena, nicht veröffentlicht) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3.1: DNA- und Proteinidentität aller bekannten PlaB Sequenzen im Vergleich zu Mip [%].** Analysiert wurden *L. pneumophila* Corby (LpC), *L. pneumophila* Paris (LpP), *L. pneumophila* Lens (LpL), *L. pneumophila* Philadelphia I (LpPhil), *L. hackeliae* (Lhack) und LLAP10. Die Sequenzabgleiche zu den Genen *mip* und *plaB* und zu den Proteinen Mip und PlaB sind im Anhang einzusehen.

<b><i>plaB</i></b>	LpC	LpP	LpL	LpPhil	Lhack	LLAP10
LpC	100	99	97	97	84	86
LpP		100	96	97	83	85
LpL			100	99	82	85
LpPhil				100	82	85
Lhack					100	86
LLAP10						100

<b><i>PlaB</i></b>	LpC	LpP	LpL	LpPhil	Lhack	LLAP10
LpC	100	99	98	98	87	89
LpP		100	97	97	87	97
LpL			100	99	86	88
LpPhil				100	86	88
Lhack					100	89
LLAP10						100

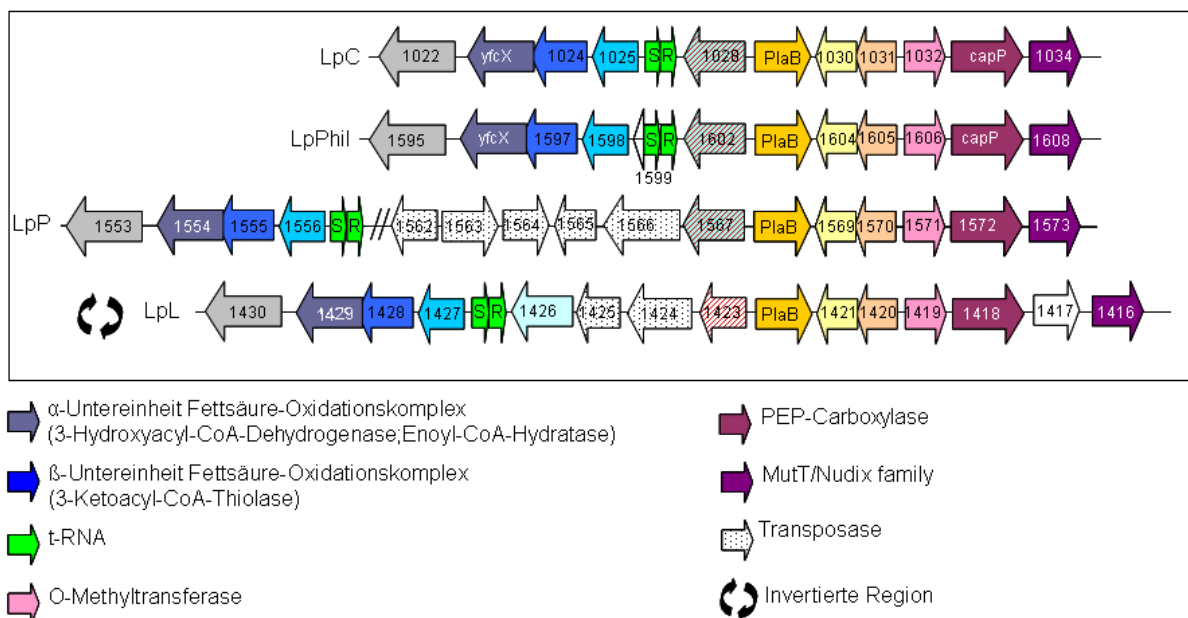
<b><i>mip</i></b>	LpC	LpP	LpL	LpPhil	Lhack	LLAP10
LpC	100	98	99	98	76	81
LpP		100	98	98	77	81
LpL			100	98	76	81
LpPhil				100	77	81
Lhack					100	78
LLAP10						100

<b><i>Mip</i></b>	LpC	LpP	LpL	LpPhil	Lhack	LLAP10
LpC	100	99	100	99	75	90
LpP		100	99	100	76	91
LpL			100	99	76	90
LpPhil				100	76	91
Lhack					100	76
LLAP10						100

Das PlaB-Gen konnte in all diesen Stämmen außer *L. micdadei* gefunden werden. Die DNA-Sequenzen der *L. pneumophila*-Stämme zeigen eine Identität von 96-99% zueinander, wobei die Identität zu den non-*pneumophila* Stämmen *L. hackelia* und LLAP10 zwischen 82 und 86% liegt (siehe Tabelle 3.1). Auf Proteinebene liegt die Identität für *L. pneumophila* Stämme bei 97-99% und für die non-*pneumophila* Stämme bei 86-97%. Damit ist die Identität

Um festzustellen, ob auch der Genombereich in der Umgebung von *plaB* konserviert ist, wurden die Nachbarschaftsgene up- und downstream von *plaB* in den Stämmen *L. pneumophila* Corby, *L. pneumophila* Philadelphia I, *L. pneumophila* Paris und *L. pneumophila* Lens untersucht. Abb. 3.1 zeigt die Genregion von *plaB*, wobei gleiche Farben homologe Gene bezeichnen.



**Abb. 3.1** Genkarte der Region um *plaB*. Es wurden die Genome von *L. pneumophila* Corby (LpC), *L. pneumophila* Philadelphia I (LpPhil), *L. pneumophila* Paris (LpP) und *L. pneumophila* Lens (LpL) verglichen. Gleichfarbige Pfeile stehen für homologe Gene, die Gennummern oder Namen sind in den Pfeilen verzeichnet. Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen zeigt die Legende. Die Genregion von *L. pneumophila* Lens ist invertiert.



Das Gen *lpc1023* (*lpg1596*, *lpp1554*, *lpl1429*) ist in allen *L. pneumophila*-Stämmen vorhanden und codiert für die  $\alpha$ -Untereinheit des Fettsäureoxidationskomplexes, die Enoyl-CoA-Dehydrogenase. Benachbart liegt das Gen *lpc1024* (*lpg1597*, *lpl1428*, *lpp1555*). Es codiert die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und damit für die  $\beta$ -Untereinheit des Komplexes. *Lpc1022* (*lpg1595*, *lpp1553*, *lpl1430*), *lpc1028* (*lpg1602*, *lpp1567*, *lpl1423*), *lpc1030* (*lpg1604*, *lpp1569*, *lpl1421*) und *lpc1031* (*lpg1605*, *lpp1570*, *lpl1420*) sind hypothetische Proteine, die keine Homologien zu bekannten Proteinen haben. *Lpc1032* (*lpg1606*, *lpp1571*, *lpl1419*) hat Ähnlichkeit zu Methyltransferasen. *Lpc1033* (*lpg1607*, *lpp1572*, *lpl1418*) codiert für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEP-Carboxylase). *Lpc1034* (*lpg1608*, *lpp1573*, *lpl1416*) hat ein Nudix-Hydrolase Motiv.

Die in *L. pneumophila* Paris zwischen *lpp1557* und *lpp1567* liegenden Gene zeigen Homologien zu Transposasen, ebenso die Gene *lpl1424* und *lpl1425*. Weiterhin findet man in allen vier Stämmen eine Serin und eine Arginin t-RNA an der gleichen Position. In t-RNAs inserierte Gene können als Inseln über horizontalen Gentransfer in andere Stämme übertragen werden (Glöckner et al., 2008; Sitkiewicz et al., 2007) Mittels *in silico* Analyse konnte keine Insertion des *plaB*-Gens in eine der benachbarten t-RNAs festgestellt werden. Somit liegt *plaB* wahrscheinlich nicht auf einer genomischen Insel.

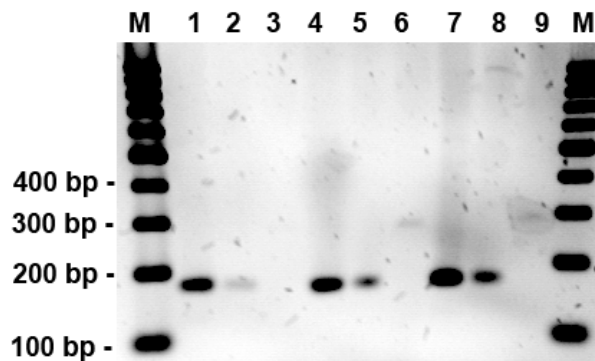
*L. pneumophila* Lens ist der einzige Stamm, in dem die gesamte Genregion von *plaB* invertiert ist. Die Gene *lpl1426* und *lpl1423* zeigen eine hohe Homologie zu den Genen *lpp1567*, *lpg1602* und *lpc1028*, aber nicht zueinander.

In allen untersuchten *L. pneumophila*-Stämmen stellt das *plaB*-Gen eine monocistronische Einheit dar, da die Nachbarschaftsgene in entgegengesetzter Richtung angeordnet sind und somit nicht in einem Operon liegen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, das *plaB*-Gen in den vier untersuchten *L. pneumophila*-Stämmen in der gleichen genomischen Region sitzt. Bei *L. pneumophila* Paris und Lens sind Transposase- ähnliche Gene eingeschoben. Die Genregion von *L. pneumophila* Lens ist invertiert. In LLAP10 und *L. hackelia* scheint das *plaB*-Gen in einem völlig anderen Genombereich lokalisiert zu sein. Die Nachbarschaftsgene des *plaB*-Gens in LLAP10 und *L. hackeliae* zeigten keine Homologien zu Genen in den oben untersuchten *L. pneumophila*-Stämmen.

### 3.1.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts

Um den Transkriptionsstartpunkt von *plaB* identifizieren zu können, wurde die RACE Methode angewandt. Mit dieser Methode kann das 5' Ende und damit die Promotorregion von mRNAs amplifiziert werden. Zunächst wurde die mRNA von exponentiell gewachsenen *L. pneumophila* Corby Kulturen in cDNA umgeschrieben, aufgereinigt und ein Poly-A-Schwanz an das 3' Ende der cDNA angehängt. Neben der selbst isolierten mRNA wurde in die Reaktionsansätze auch eine im Kit enthaltene RNA hinzugefügt. Dadurch konnte die erfolgreiche Durchführung des Versuchs mit im Kit enthaltenen Primern in einer Kontroll-PCR überprüft werden.



**Abb. 3.2 Überprüfung der RACE-Reaktionen mittels Kontroll-RNA.** Überprüft wurden die cDNA Synthese (Spur 1,4,7), die Aufreinigung (Spur 2,5,8), Primer: neo3-U/neo2-R, Produkt: 157 bp; das Anfügen des Poly-A-Schwanzes (Spur 3,6,9), Primer: neo2-R/oligo(dT)-Anker, Produkt: 293 bp. Versuch 1 (Spur 1-3), Versuch 2 (Spur 4-6) und Versuch 3 (Spuren 7-9), M, 100 bp DNA Größenstandard.

In Abb. 3.2 ist zu sehen, dass die Kontroll-RNA nicht degradiert wurde (Abb. 3.2). In allen drei Versuchsansätzen ergaben sich für die Kontroll-PCR's der cDNA Synthese (Abb. 3.2 Spuren 1,4,7) und der Aufreinigung (Abb. 3.2 Spuren 2,5,8) Banden in der erwarteten Höhe. Die PCR für das Anfügen des Poly-A-Schwanzes ergab nur eine sehr schwache Bande bei 293 bp, da für diesen Reaktionsschritt nur 1 µl der aufgereinigten cDNA verwendet wurde (Abb. 3.2 Spuren 3,6,9). Die PCRs zeigen, dass die cDNA Synthese, die Aufreinigung und das Anhängen des Poly-A-Schwanzes erfolgreich waren. Nach der Kontrolle der Reaktionsschritte wurde das 5' Ende der *plaB* cDNA mit dem Oligo(dT)-Anker-Primer und dem spezifischen RACE2 Primer amplifiziert.

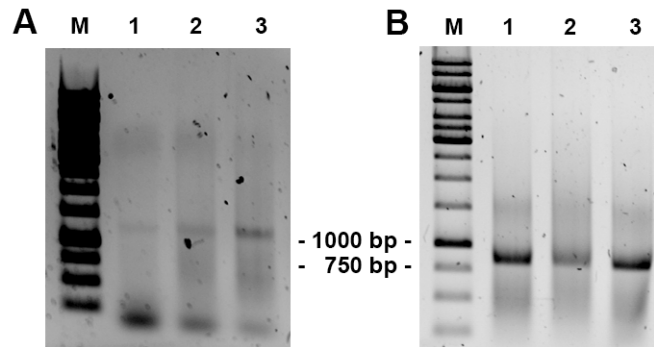


Abb. 3.3 Amplifikations-PCR vom 5' Ende der *plaB* cDNA. Die cDNA wurde (A) mit den Primern oligo(dT)-Anker/RACE2, Produkt ca. 1100 bp und (B) anschließend mit den Primern oligo(dT)-Anker/RACE3, Produkt ca. 800 bp amplifiziert. Spur 1-3, RNA 1-3; M, 1 kb DNA Größenstandard.

Das PCR-Produkt hatte eine Höhe von etwa 1100 bp, war aber nur in sehr geringer Menge vorhanden (Abb. 3.3 A). Daher wurde eine zweite PCR-Amplifikation mit dem Oligo(dT)-Anker-Primer und dem spezifischen RACE3 Primer durchgeführt (Abb. 3.3 B). Nach dieser PCR lag ausreichend viel PCR-Produkt vor, welches aufgereinigt wurde. Mit dem Primer RACE3 wurde für alle drei aus unterschiedlichen *L. pneumophila* Corby Flüssigkulturen stammenden RNA Proben ein 760 bp großes Stück sequenziert (Abb. 3.4 A).

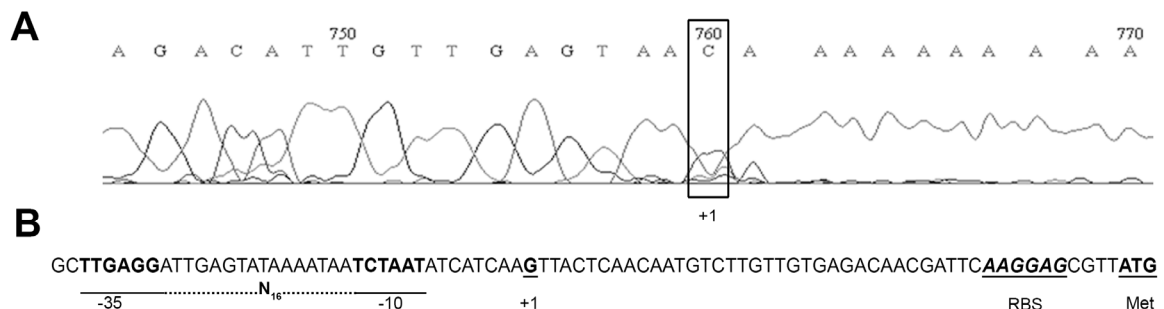


Abb. 3.4 Sequenz des 5' Endes der *plaB* mRNA. (A) Die Sequenzierung wurde mit dem RACE-PCR Produkt und dem Primer RACE3 durchgeführt. Der Transkriptionsstart (+1) liegt unmittelbar vor der durch das Anhängen des oligo(dT)-Ankerprimers erzeugten Oligo-A-Sequenz. (B) Upstreamsequenz von *plaB*. Fett gedruckt sind das Startcodon (Met, Methionin), die Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Transkriptionsstart (+1) sowie eine mögliche RpoD  $\sigma$ -Faktor Bindungsstelle mit -10 Box einem 16 Nucleotide langem Spacer (N<sub>16</sub>) und -35 Box. Die Sequenzierung ergab für alle drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche den gleichen Transkriptionsstartpunkt.

Durch einen Vergleich mit der Genomregion von *plaB* konnte gezeigt werden, dass mit dem Primer RACE3 der vor der Primerbindungsstelle liegende Bereich von *plaB* sowie einige Nukleotide vor dem Startcodon sequenziert wurden. Davor lag die Poly-(A)-Sequenz, die

durch das Poly-(A)-tailing und die Amplifikation mit dem oligo(dT)-Anker Primer an das 5' Ende angehängt worden war. Die letzte sequenzierte Base vor der Poly-(A)-Sequenz entspricht der ersten Base der *plaB* mRNA und somit dem Transkriptionsstart +1 G (Abb. 3.4). Die Bestimmung des Startpunktes ermöglichte die Suche nach möglichen  $\sigma$ -Faktor Bindungsstellen. Die Sequenz eines möglichen RpoD-abhängigen Promotors lautet TTGAGG-N<sub>16</sub>-TCTAAT.

### 3.1.3 Wachstumsphasen-spezifische Expression

Zur Untersuchung des PlaB-Proteins wurden Wachstumskurven von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der Mutante *L. pneumophila* Corby *plaB1*, der Komplementante *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) und dem PlaB überexprimierenden Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) in YEB-Flüssigmedium angefertigt und die OD<sub>600</sub>=0,7 als früh-exponentielle (EE), OD<sub>600</sub>=1 als exponentielle (E), OD<sub>600</sub>=2 als spät-exponentielle (LE) und OD<sub>600</sub>=2,5 als stationäre (S) Wachstumsphase definiert.

#### 3.1.3.1 Genexpression in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Das Wachstum von *Legionella* ist sowohl intrazellulär als auch in Flüssigmedien durch einen biphasischen Lebenszyklus gekennzeichnet. Dabei entspricht das exponentielle Wachstum der replikativen Phase und stationäre Kulturen weisen die Charakteristika der transmissiven Phase auf. Um festzustellen, in welcher Phase das *plaB*-Gen transkribiert wird wurde eine Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurde *L. pneumophila* Corby in YEB-Flüssigmedium angezogen und aus der exponentiellen (E), der spät-exponentiellen (LE) und der stationären (S) Phase die Gesamt-RNA isoliert. Durch eine Kontroll-PCR mit *rpoN* – spezifischen Primern wurde sichergestellt, dass sich keine DNA mehr in den RNA Proben befand. In der anschließenden RT-PCR mit dem Omniscript-RT-PCR Kit (Qiagen) wurde die RNA jeder Wachstumsphase zunächst in DNA umgeschrieben und dann mit *plaB*-spezifischen Primern amplifiziert. Die RT-PCR mit spezifischen Primern für *rpoN* und *flaA* diente zur Kontrolle (Abb. 3.5).

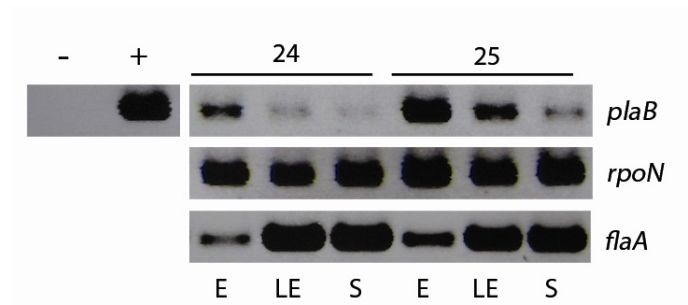


Abb. 3.5 RT-PCR zur *plaB* Expression in verschiedenen Wachstumsphasen von *L. pneumophila* Corby. Die PCR wurde mit 24 und 25 Zyklen durchgeführt. Das nahezu konstitutiv exprimierte *rpoN*-Gen und das ab der spät-exponentiellen Phase exprimierte *flaA* dienten als Kontrolle. (-) Negativkontrolle für DNA Kontamination; (+) Positivkontrolle mit chromosomaler *L. pneumophila* Corby DNA; (E) exponentielle, (LE) spät-exponentielle; (S) stationäre Wachstumsphase. Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Der alternative  $\sigma^{54}$ -Faktor *rpoN* wird über die Wachstumsphasen hinweg annähernd gleichmäßig exprimiert, während *flaA* die wichtigste Strukturkomponente des Flagellums ist und daher ab dem Übergang in die post-exponentielle Phase benötigt wird (Brüggemann et al., 2006; Heuner et al., 1999). Das *plaB*-Gen wurde hauptsächlich in der exponentiellen Phase transkribiert und nahm über die spät-exponentielle zur stationären Phase stark ab. Die RT-PCR wurde mit 24 und 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. Nach 24 Zyklen war in der exponentiellen Phase für das *plaB*-Gen eine schwächere Bande zu sehen, als für die Kontrollgene. Somit lag weniger *plaB*-Transkript als *rpoN*- oder *flaA*- spezifische mRNA in der eingesetzten Gesamt-RNA vor. Dies zeigt, dass die Transkriptionsrate des *plaB*-Gens im Vergleich zu *rpoN* nur sehr gering ist.

### 3.1.3.2 Enzymatische Aktivität in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Um die Wachstumsphasen-spezifische enzymatische Aktivität des PlaB-Proteins zu untersuchen, wurde *L. pneumophila* Corby, die *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante, die *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) Komplementante und der PlaB überexprimierende Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) in YEB-Flüssigmedium angezogen, und von der früh-exponentiellen bis zur stationären Phase Proben entnommen. Da das PlaB-Protein zell-assoziiert vorliegt (Flieger et al., 2004), wurden die Proben pelletiert, gewaschen und schließlich durch Ultraschall lysiert. Die Lysate wurden auf Humanblut-Platten inkubiert (Abb. 3.6 A) und in einem Phospholipase A Aktivitätsassay (PLA-Assay) untersucht (Abb. 3.6 B).

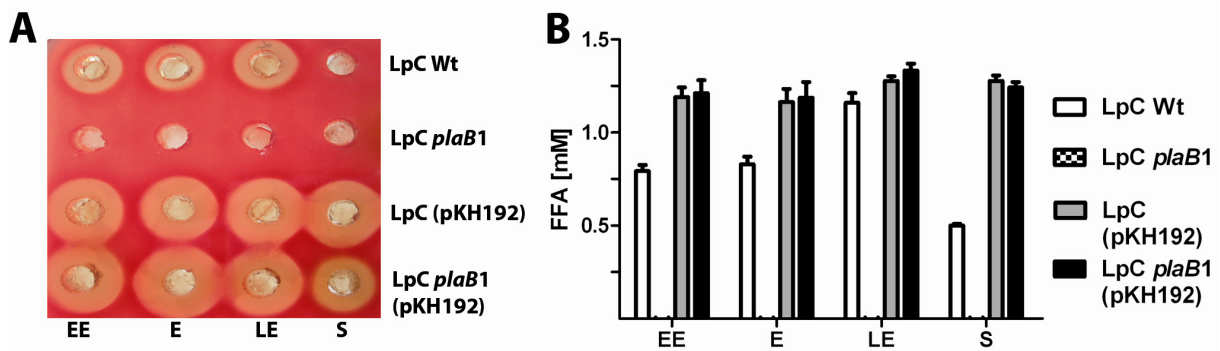


Abb. 3.6 (A) Humanblut-Plattenassay und (B) Phospholipase A Aktivitätsassay des PlaB-Proteins von *L. pneumophila* Corby (LpC Wt), der *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante (LpC *plaB1*), dem PlaB überexprimierenden Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) (LpC (pKH192)) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) (LpC *plaB1* (pKH192)) in verschiedenen Wachstumsphasen. (EE) früh-exponentielle, (E) exponentielle, (LE) spät exponentielle; (S) stationäre Wachstumsphase. Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Daten des PLA-Assays sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Humanblut-Platten zeigten nach einer zweitägigen Inkubation bei 37°C deutliche Hämolysehöfe um die *L. pneumophila* Corby Lysate aus den früh- bis spät-exponentiellen Phasen, während die Lysate aus der stationären Phase nicht hämolytisch waren (Abb. 3.6 A). Die *plaB*-Mutante zeigte zu keinem Zeitpunkt hämolytische Aktivität. Dieser Effekt ließ sich durch Einbringen des *plaB*-Gens auf dem Vektor pBCKS (pKH192) komplementieren. Da es sich bei diesem Vektor ein high-copy Plasmid handelt und die Transkription von *plaB* nur sehr niedrig ist (siehe 3.1.2 und 3.1.3.1) war die hämolytische Aktivität höher, als bei *L. pneumophila* Corby Wildtyp. Eine ebenso starke hämolytische Aktivität ließ sich durch das Einbringen von pKH192 in die wildtypischen Legionellen erreichen.

Die PLA-Aktivität von *L. pneumophila* Corby stieg von der früh-exponentiellen zur spät-exponentiellen Phase an und sank in der stationären Phase stark ab (Abb. 3.6 B). Eine enzymatische Aktivität der *plaB*-Mutante war auch in diesem Assay nicht messbar. Der Effekt wurde wiederum komplementiert und führte zu einer mit dem Überexpressionsstamm vergleichbaren PLA-Aktivität. Somit wurde die enzymatische Aktivität von PlaB in *L. pneumophila* Wildtyp hauptsächlich während des exponentiellen Wachstums detektiert.

### 3.2 Studien zur Lokalisation von PlaB

Während eine *plaB*-Insertionsmutante in *L. pneumophila* Corby bereits zur Verfügung stand (Flieger et al., 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mutante hergestellt, in der das gesamte *plaB*-Gen gegen eine Kanamycinresistenzkassette ausgetauscht wurde. Obwohl die Insertionsmutante durch das Einfügen der Kanamycinkassette in der C-terminalen Hälfte des PlaB-Proteins keine membranassoziierte hämolytische oder Phospholipase A Aktivität mehr besitzt, könnten Teilstücke des PlaB-Proteins translatiert werden. Polyklonale Antikörper könnten möglicherweise also auch in der PlaB-Insertionsmutante ein Signal erzeugen. Die *plaB* Knock-out Mutante wurde hergestellt, um in den Versuchen zur Lokalisation des PlaB-Proteins über Sucroседichtegradientenzentrifugation als Kontrolle zu dienen (3.2.4). Da insbesondere für Lokalisationsstudien eine direkte Detektion von PlaB wünschenswert ist, wurden polyklonale PlaB-Antikörper produziert (3.2.2).

Das PlaB-Protein wurde bereits als die stärkste zell-assoziierte Phospholipase A Aktivität bei *L. pneumophila* beschrieben (Flieger et al., 2004). Um die Lokalisation des PlaB-Proteins zu bestimmen, wurden exponentiell gewachsene Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby aufgeschlossen. Zunächst wurde eine „einfache Fraktionierung“ durchgeführt, bei der die Membranen vom Cytosol und dem Kulturüberstand getrennt wurden (3.2.3). In einem weiteren Versuch wurde die innere Membran von der äußeren Membran getrennt (3.2.4). Die Detektion von PlaB wurde über die enzymatische Aktivität des Proteins durchgeführt, da mit dem PlaB Antikörper nur PlaB in den komplementierenden Stämmen *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) und *L. pneumophila* Corby *plaB::Km* K1 (pKH192) sowie dem *plaB*-Überexpressionsstamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) detektierbar war (3.2.2).

#### 3.2.1 Herstellung einer *plaB* knock-out Mutante in *L. pneumophila* Corby

In dieser Arbeit wurde in *L. pneumophila* Corby eine *plaB* knock-out Mutante hergestellt, bei der das *plaB*-Gen durch homologe Rekombination gegen eine Kanamycinkassette ausgetauscht wurde (*L. pneumophila* Corby *plaB::Km*) (Abb. 3.7). Das *plaB*-Gen wurde mit seinen flankierenden Bereichen von 500 bp aus der chromosomalen DNA von *L. pneumophila* Corby amplifiziert. Dazu wurden die Primer PlaB-500-U und R benutzt, was zu einem Produkt von 2423 bp (496+1425+499 bp) führte. Dieses Fragment wurde in den Vektor pGEMTeasy ligiert und in *E. coli* DH5α elektroporiert. Die Transformanten wurden in einer

PCR mit den Primern PlaB-500-U/R auf die Aufnahme des Konstruktes hin überprüft (Abb. 3.8 A). Das re-isolierte Plasmid wurde durch eine inverse PCR mit den Primern PlaB-Inv-U und PlaB-MutXbaI-2-R linearisiert. Durch den Primer PlaB-MutXbaI-2-R wurde eine *XbaI* Restriktionsschnittstelle generiert. Das PCR-Produkt enthielt die Vektor-DNA mit den flankierenden Regionen von *plaB* ohne das Gen selbst und hatte eine resultierende Größe von 4000 bp (496+499+3000 bp) (Abb. 3.8 B).

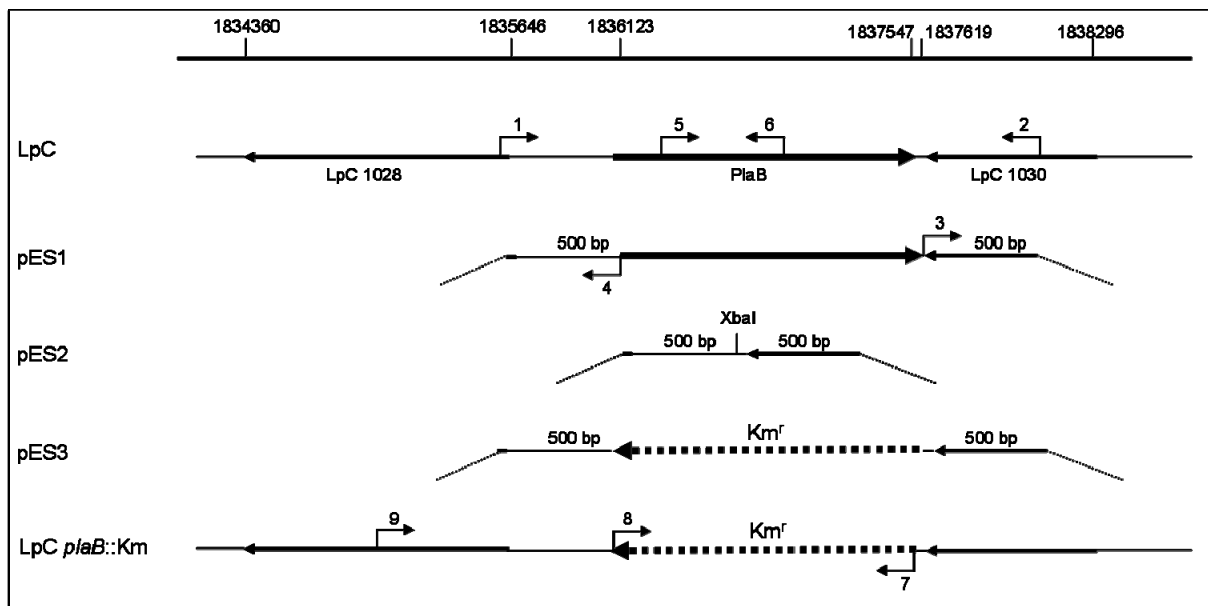


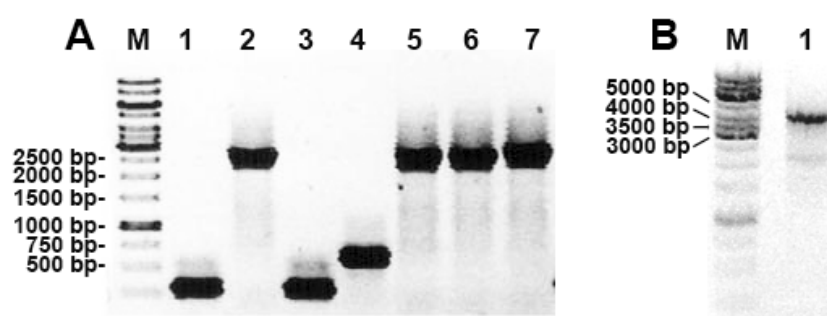
Abb. 3.7 Herstellung der *L. pneumophila* Corby *plaB::Km* knock-out Mutante. Die PlaB-DNA von *L. pneumophila* Corby (LpC) wurde mit 500bp flankierenden Bereichen amplifiziert und in den Vektor pGEMTeasy kloniert (pES1). Durch inverse PCR wurde die *plaB* Sequenz aus dem Konstrukt entfernt (pES2) und durch eine Kanamycinresistenzkassette ersetzt (pES3). Über natürliche Transformation und homologe Rekombination wurde die *plaB* knock-out Mutante hergestellt (LpC *plaB::Km* K1 und K5). Primer: 1, PlaB-500-U; 2, PlaB-500-R; 3, PlaB-Inv-U; 4, PlaB-Mut-XbaI2-R; 5 PlaB-F; 6, PlaB-R; 7, Km<sup>r</sup>-XbaI-U; 8, Km<sup>r</sup>-XbaI-R; 9, PlaB-Mut-Ko-U.

Um den ringförmigen Vektor aus dem Ansatz zu entfernen, wurde ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. Der anschließende Klenow-Verdau ermöglichte die Religation des PCR Produktes. Die so erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* DH5a elektroporiert und isoliert. Um eine Kanamycinkassette zwischen die flankierenden Sequenzen einzubringen, wurden sowohl das religierte Plasmid als auch die Kassette einem Restriktionsverdau mit *XbaI* unterzogen und anschließend ligiert. Die Dephosphorylierung des Vektors schloss die Religation des Plasmids ohne die Kassette aus. Das neue Konstrukt wurde wiederum in *E. coli* elektroporiert, re-isoliert und in einer PCR überprüft (Abb. 3.9). Da die PCR für Klon 3 mit den Primern PlaB-500-U/Km<sup>r</sup>XbaI-R eine unerwartete Bande bei 500 bp ergab (Abb. 3.9 Spur 1), wurde



Klon 6 zur weiteren Klonierung verwendet. Dieser zeigte mit allen gewählten Kontroll-Primern das gewünschte Ergebnis (Abb. 3.9 Spuren 5 bis 8). Mit den Primern PlaB-500-U/R wurden die flankierenden Regionen von PlaB mit inserierter Kanamycinkassette amplifiziert und über natürliche Transformation in *L. pneumophila* Corby eingebracht. Die homologe Rekombination der flankierenden Regionen und der daraus resultierende Austausch von chromosomalem *plaB* gegen die Kanamycinkassette wurde mittels PCR bestätigt (Abb. 3.10). Die positiven Klone zeigten in der PCR kein Produkt mit den Primern PlaB-F/R (Abb. 3.10 Spur 3, 5, 7, 9, 11) und ein Produkt der Größe 2027 bp mit den Primern PlaB Mut Ko-U/Km<sup>r</sup>-XbaI-U (Abb. 3.10 Spur 4, 6, 8, 10, 12). Zur weiteren Analyse wurden die Klone 1 und 5 verwendet (Abb. 3.10 Spur 3/4 und Spur 7/8).

Abb. 3.11 zeigt einen Western Blot mit dem Antikörper plaB1, in dem auch Gesamtzelllysate von *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km Klon 1 und Klon 5 sowie der Komplementante *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1(pKH192) aufgetragen wurden (siehe 3.2.2.1). Der vollständige Verlust der enzymatischen Aktivität von *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 ist in Abb. 3.18, Abb. 3.19, Abb. 3.20 und Abb. 3.22 zu sehen. Die vollständige Komplementation dieses Defektes durch *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1(pKH192) ist in den Abb. 3.19 und Abb. 3.20 ersichtlich. Weiterhin wurde eine Infektion von *A. castellanii* durchgeführt. Wie Abb. 3.23 zeigt, hat *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 keinen Replikationsdefekt.



**Abb. 3.8** Klonierung des *plaB*-Gens in Vektor pGEMTeasy und inverse PCR. (A) Kontroll-PCR zur Generierung von pES1 (*plaB*-Gen mit seinen 500 bp flankierenden Sequenzen in Vektor pGEMTeasy), Primer: PlaB 500-U/R, Produkt: 2423 bp, positive Klone: Spur 2,5,6,7. (B) Die inverse PCR von pES1 führte zu einem linearisierten Produkt aus den 500 bp flankierenden Sequenzen und der Sequenz des pGEMTeasy Vektors; Primer: PlaB-Inv-U/PlaB-MutXbaI-2-R, Produkt: 3995 bp, Spur 1. M, 1-kb DNA Größenstandard.

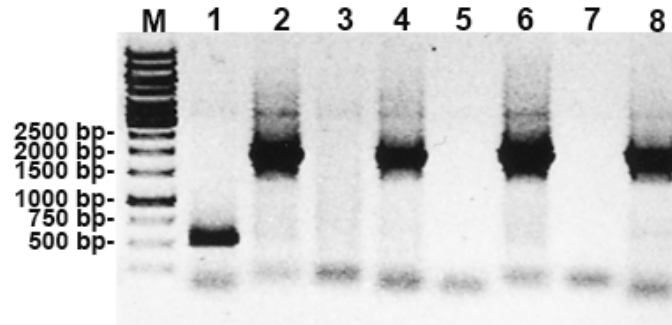


Abb. 3.9 Kontroll-PCR zur Generierung von pES3 durch Religation und Insertion einer  $Km^r$  Kasette in pES2. Spuren 1-4 Klon 3, Spur 5-8 Klon 6, Primer: Spur 1/5: PlaB-500-U/ $Km^r$ XbaI-R, Spur 2/6: PlaB 500-U/ $Km^r$ XbaI-U, Spur 3/7 PlaB-500-R/ $Km^r$ -XbaI-U, Spur 4/8 PlaB-500-R/ $Km^r$ -XbaI-R. Spur 1, Produkt: 500 bp; Spuren 2,4,6,8, Produkt: 1900 bp. M, 1-kb DNA Größenstandard.

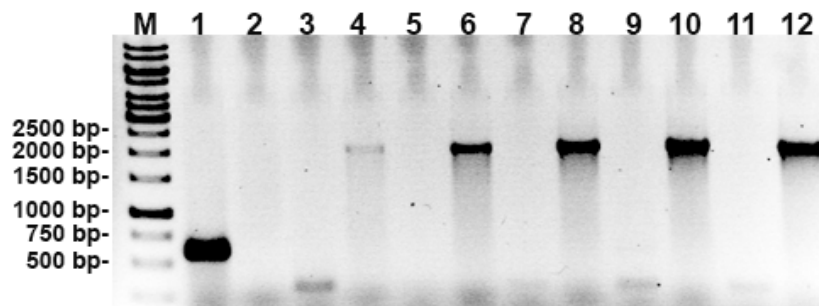
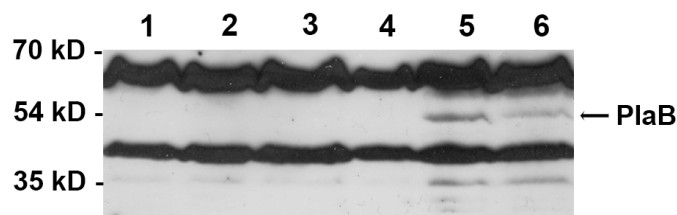


Abb. 3.10 Klonierung der *L. pneumophila* Corby *plaB*:: $Km$  knock-out Mutante. Kontroll-PCR zur homologen Rekombination der aus pES2 amplifizierten DNA (500 bp flankierenden Sequenzen und der  $Km^r$  Kasette) in *L. pneumophila* Corby. Spur 1/2: *L. pneumophila* Corby, Spur 3/4 *plaB*-Mutante Klon 1, Spur 5/6 Mutante Klon 4, Spur 7/8 Klon 5, Spur 9/10 Klon 40. Primer: Spur 1,3,5,7,9,11 PlaB-F/R (Produkt: 588 bp); Spur 2,4,6,8,10,12 PlaB-Mut-Ko-U/ $Km^r$ -XbaI-U (Produkt: 2027 bp). M, 1-kb DNA Größenstandard.

### 3.2.2 Polyklonale Antikörper gegen das PlaB-Protein

#### 3.2.2.1 Antikörper gegen ein synthetisch hergestelltes PlaB-15-mer

Aus der Aminosäuresequenz von PlaB wurde das 15-mer 5'-GRIKSFFEGIEPGKC-3' durch *in silico* Analyse als ein geeignetes Peptid für die Antikörperproduktion ausgewählt (Abb. 3.16), synthetisiert und zur Herstellung des Antikörpers (PlaB1) verwendet. Das nach der Immunisierung eines Kaninchens erhaltene Serum wurde gegen die *L. pneumophila* Corby *plaB*-Mutante und *E. coli* DH5 $\alpha$  präadorbiert und anschließend im Western Blot getestet. Es wurden Lysate von *L. pneumophila* Corby, der *L. pneumophila* Corby *plaB1* Insertionsmutante, den *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 und K5 knock-out Mutanten, dem PlaB-überexprimierenden Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) und der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) Komplementante in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 in PBS/1% Milch eingesetzt, der HRP-gekoppelte  $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper wurde 1:5000 in PBS/1% Milch verwendet. Zur Detektion wurde das hochsensitive Detektionskit ECL-Advance eingesetzt.



**Abb. 3.11 Western Blot mit PlaB1 Antikörper gegen PlaB (53,7 kD).** Es wurden verwendet die Lysate aus: (1) *L. pneumophila* Corby; (2) *L. pneumophila* Corby *plaB1*; (3) *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1; (4) *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K5; (5) *L. pneumophila* Corby (pKH192); (6) *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192).

Das PlaB-Protein konnte in den Stämmen *L. pneumophila* Corby (pKH192) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) detektiert werden, die PlaB auf dem high-copy Vektor pBCKS enthielten. Dagegen konnte wildtypisches PlaB nicht detektiert werden. Auch eine Vervielfachung der eingesetzten Proteinmenge konnte kein anderes Ergebnis erzielen. Weiterhin zeigte der PlaB Antikörper trotz der zuvor durchgeführten Präadsorption sehr starke Kreuzreaktionsbanden. Das Präimmunserum zeigte keine Banden und schloss somit

eine Infektion des Kaninchens als Grund für die unspezifischen Banden aus. Somit handelte es sich bei den Banden um Kreuzreaktionen des PlaB1 Antiserums mit anderen Proteinen aus *L. pneumophila* Corby.

### 3.2.2.2 Antikörper gegen überexprimiertes und aufgereinigtes PlaB

Antikörper, die durch die Immunisierung mit in *E. coli* überexprimierten und aufgereinigten Gesamtprotein hergestellt werden, zeichnen sich im Allgemeinen durch geringe Kreuzreaktionen bei guter Antigenerkennung aus. Deshalb wurden zwei Kaninchen mit aufgereinigtem PlaB-Protein immunisiert (Seqlab, Göttingen).

Dazu wurde PlaB als N- oder C-terminales Calmodulinbindeprotein Fusionsprotein (53,7 kD + 4kD) (CBP-PlaB) in dem Expressionsvektor pCAL in *E. coli* BL21(DE3) pLys überexprimiert. *E. coli* (pKH199C) trägt die N-terminale Fusion. *E. coli* (pKH199D) trägt die C-terminale Fusion, wobei die Base Cytosin an Position 19 gegen Thymin ausgetauscht ist (C19T). Dies war notwendig, um die PlaB- interne *NcoI* Schnittstelle zu eliminieren. *NcoI* musste zur Herstellung von pKH199D verwendet werden. Der Basenaustausch führte im Codon 7 zu einem Aminosäureaustausch (His7Tyr).

Die Induktion der Expression wurde in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot überprüft. Die Detektion erfolgte über den CBP-Tag (siehe Abb. 3.12 A) und mit dem PlaB1 Antikörper (siehe Abb. 3.12 B).

Eine Induktion mit 2 mM IPTG für drei Stunden wurde als optimal ermittelt, da eine weitere Induktion nicht zu mehr Protein führte (Abb. 3.12 Spuren 5-12). Weiterhin zeigte sich für die C-terminale CBP-PlaB Fusion (siehe Abb. 3.12 A Spuren 7 und 8) eine stärkere Bande als für die N-terminale Fusion (siehe Abb. 3.12 A Spuren 5 und 6). Mit dem PlaB1 Antikörper konnte das C-terminale Fusionsprotein nach einer Induktion von drei Stunden detektiert werden (siehe Abb. 3.12 B). Somit wurde PlaB mit C-terminaler Fusion entweder besser exprimiert oder konnte über den CBP-„tag“ besser detektiert werden.

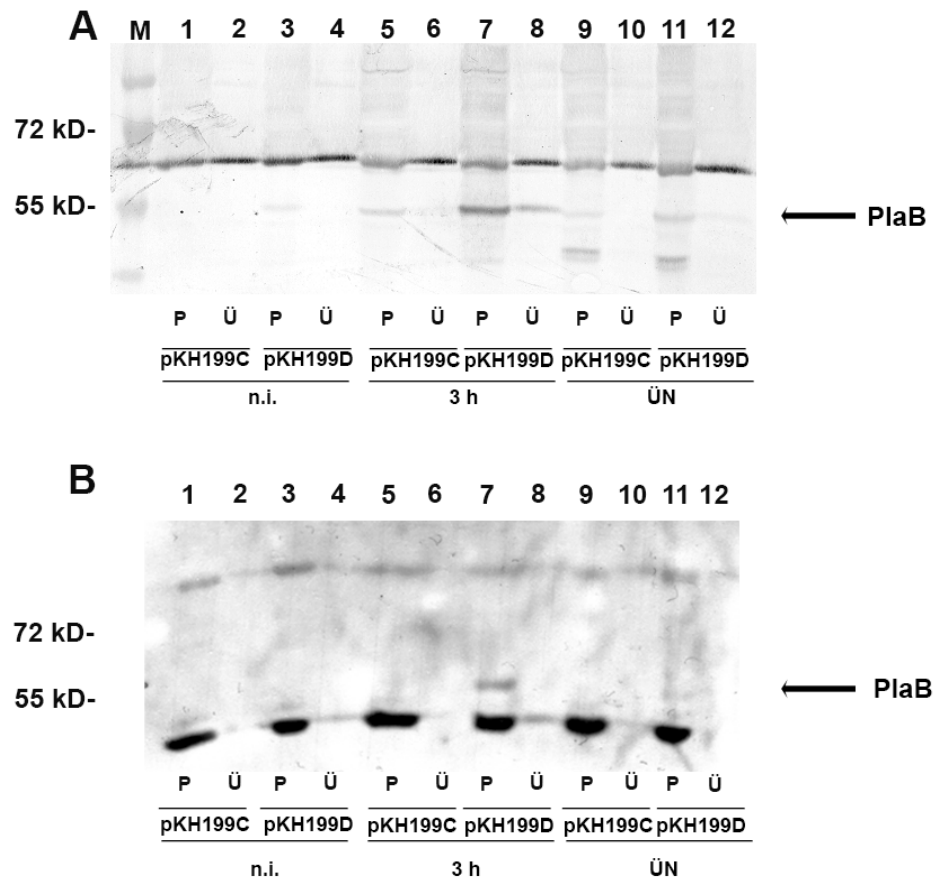
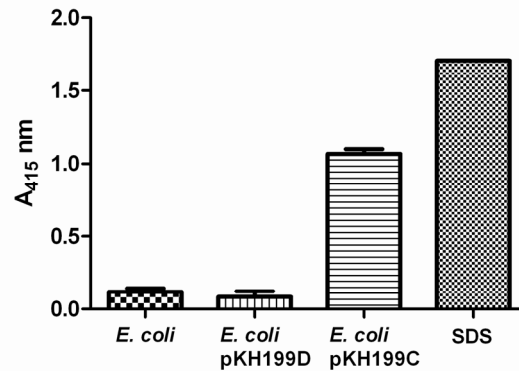


Abb. 3.12 Western Blots der Überexpression von CBP-PlaB in *E. coli* BL21 (DE3) pLys. (A) Detektion mit einem Antikörper gegen den CBP-„tag“. (B) Detektion mit dem PlaB1 Antikörper. M, 1-kb DNA Größenstandard; P, Pellet; Ü, Überstand; pKH199C, *E. coli* BL21 (DE3) pLys (pKH199C), N-terminale CBP-PlaB Fusion; pKH199D, *E. coli* BL21 (DE3) pLys (pKH199D), C-terminale PlaB-CBP Fusion; n.i., nicht induziert; 3 h, 3 h induziert; ÜN, über Nacht induziert.

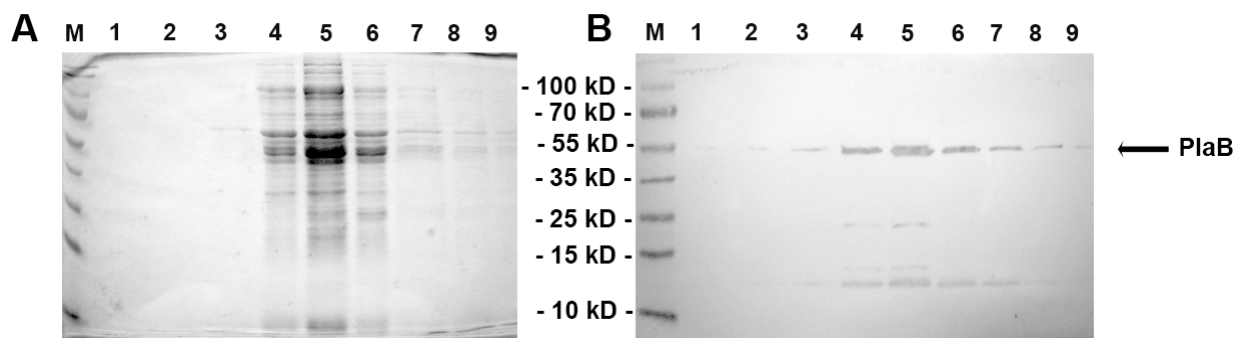
Parallel wurde auch die enzymatische Aktivität der N- und C-terminalen Fusionen in *E. coli* überprüft (siehe Abb. 3.13).

N-terminal fusioniertes PlaB (*E. coli* (pKH199C)) zeigte eine 12,8 fach stärkere hämolytische Aktivität als C-terminal fusioniertes PlaB-Protein (*E. coli* (pKH199D)). Somit wurde die N-terminale Fusion (*E. coli* (pKH199C)) im Western Blot nicht detektiert, die enzymatische Aktivität war aber vorhanden. Die C-terminale Fusion (*E. coli* (pKH199D)) konnte im Western Blot detektiert werden, war aber nicht aktiv.



**Abb. 3.13** Flüssighämolyseassay der N- und C-terminalen CBP-PlaB Fusionen. Lysate von *E. coli* BL21(DE3)pLysS (pKH199C) (N-terminale CBP-PlaB Fusion), *E. coli* BL21(DE3)pLysS (pKH199D) (C-terminale CBP-Fusion) wurden auf humane Erythrozyten zentrifugiert und für 7 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nonhämolytische *E. coli* Dh5 $\alpha$ . SDS-lysierte Erythrozyten wurden 2,5 fach verdünnt gemessen und dienten als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

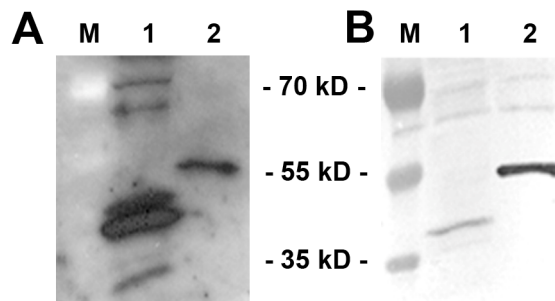
Zur weiteren Aufreinigung wurde das C-terminale PlaB Fusionsprotein aus *E. coli* (pKH199D) verwendet, da möglichst viel Protein über den CBP-„tag“ aufgereinigt werden sollte. Dabei ist die Aktivität des Proteins nicht notwendig. Die Aufreinigung erfolgte über eine Calmodulinsäule. Die Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt.



**Abb. 3.14** Überexpression von C-terminal fusioniertem CBP-PlaB in *E. coli*. Die Eluate der Calmodulin-Affinitätsfraktionierung wurden im (A) Coomassiegele und im (B) Western Blot mit einem gegen den CBP-„tag“ gerichteten Antikörper detektiert. M, 1-kb DNA Größenstandard; PlaB 53,7 kD, CBP-„tag“ 4 kD.

Das mit Coomassie gefärbte Gel zeigte, dass die Fraktionen 4 bis 6 das meiste Protein enthielten (Abb. 3.14 Spuren 4 bis 6). In einer parallel durchgeführten Western Blot-Analyse der Fraktionen wurde das CBP-PlaB über den CBP-„tag“ detektiert (Abb. 3.14 B Spuren 4 bis 6). Es zeigte sich eine Bande bei ca. 57 kD sowie weitere Banden auf der Höhe von 25 und

ca. 12 kD. Die Bande bei 57 kD entspricht der erwarteten Größe des CBP-PlaB-Proteins (53,7 kD PlaB + 4 kD CBP-„tag“). Die tiefer liegenden Banden könnten Abbauprodukte des CBP-PlaB-Proteins oder Kreuzreaktionsbanden darstellen. Um zu bestätigen, dass es sich bei der 57 kD Bande tatsächlich um das PlaB-Protein handelte, wurde das Eluat der Fraktion 5 in einem doppelten Ansatz über eine SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Durch das Auseinanderschneiden der Membran konnte das PlaB-Protein parallel über den CBP-„tag“ und den PlaB1 Antikörper detektiert werden (Abb. 3.15). Beide Antikörper zeigten eine Bande bei 57 kD. Somit konnte diese Bande eindeutig dem PlaB-Protein zugewiesen werden.



**Abb. 3.15** Detektion des PlaB-CBP Proteins im Eluat der Fraktion 5. Die Detektion erfolgte durch Western Blot mit (A) dem PlaB1 Antikörper gegen PlaB oder (B) dem Antikörper gegen des CBP-„tag“. Spur 1: nicht induzierte Kontrolle; Spur 2: Eluat aus Fraktion 5; M, 1-kb DNA Größenstandard; PlaB 53,7 kD, CBP-„tag“ 4 kD.

Das gesamte Eluat der Fraktionen 4-6 wurde in einer großen SDS-PAGE Kammer über Nacht aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die 57 kD große PlaB-Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und für die Immunisierung verwendet. Die Gelanteile wirken dabei als Adjuvanz.

Nach Abschluß des dreimonatigen Immunisierungsprotokolls wurde mit Lysaten von *L. pneumophila* Corby, *L. pneumophila* *plaB1*, *L. pneumophila* Corby (pKH192) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) ein Western Blot unter Einsatz des Antikörpers PlaB2 durchgeführt. Der Antikörper wurde gegen *E. coli* Dh5α präadsorbiert. Für den Western Blot wurde der Primärantikörper unverdünnt und der α-Kaninchen-Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:5000 eingesetzt. Als Kontrolle wurden dieselben Proben in einem parallelen Western Blot mit dem PlaB1 Antikörper untersucht, wobei sich das PlaB-Protein wie gewohnt in den Lysaten von *L. pneumophila* Corby (pKH192) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

Mit dem PlaB2 Antikörper konnte PlaB nicht detektiert werden, da keine Bande in Höhe von 54 kD auftrat. Weiterhin waren die auftretenden Kreuzreaktionbanden für alle Lysate gleich. Dies schließt aus, dass das PlaB-Protein modifiziert vorliegt und so eine von 54 kD abweichende Bande dem PlaB-Protein zuzuordnen wäre. Da nach der Immunisierung mit überexprimiertem PlaB-Protein im Antiserum kein gegen PlaB gerichteter PlaB2 Antikörper vorhanden war und der durch die Immunisierung mit dem 15-mer hergestellte PlaB1 Antikörper das PlaB-Protein nicht in wildtypischen Legionellen detektieren konnte, wurde ein drittes Immunisierungsprotokoll durchgeführt.

Für die Herstellung des PlaB3 Antikörpers wurden die beiden Peptide 5'-ENQSKQGKLDIQVGN-3' und 5'-QALAYYRLLDFHSSLADIHK-3' synthetisch hergestellt und gemeinsam zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Metabion AG, Planegg/Martinsried). Diese Peptide liegen in einem weniger hydrophoben Bereich als das für die Herstellung des PlaB1 Antikörpers verwendete Peptid (Abb. 3.16). Dies erleichtert die Aufreinigung und erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass das Epitop an einer für den Antikörper besser zugänglichen Stelle im Protein liegt und das PlaB-Protein auch in wildtypischen Legionellen im Western Blot detektiert werden kann.

Nach Abschluß des Immunisierungsprotokolls mit fünf durchgeführten Immunisierungen wurden die Seren über eine Säule aufgereinigt. ELISA-Tests zeigten einen sehr hohen Antikörper-Titer im Serum. Leider konnte mit dem PlaB3 Antikörper in Western Blot Analysen wieder kein PlaB detektiert werden.

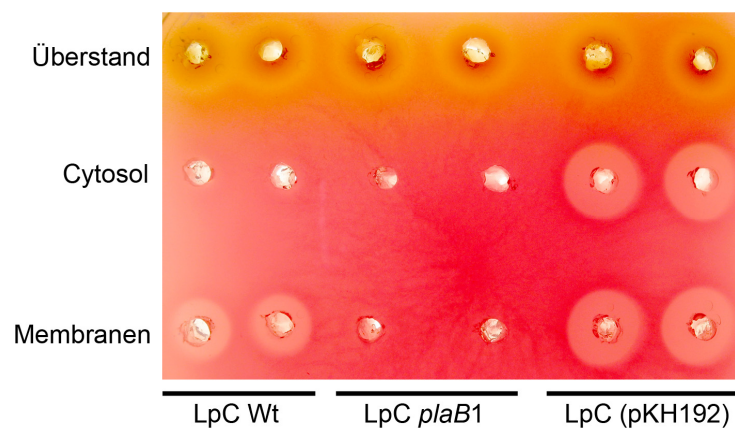
```
>plaB - 1101907: 1103331 MW: 53703.023
MIVIFVHGWSVTHNTYGELPQWLENQSKQGKLDIQVGNIYLGRIYISFDDTIVTVDDIARA
FDQAVRDEIADKL RDGQRFACITHSTGGPIVRK WMDLYFKNNLAKCPLSHLIM LAPANHG
SALAQLGKSRL GRIKSFFEGIEPGKCLDWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGVYSFVL
TGQKIDRQFYDAVN SYTGESGSDGVVRVAATNMNYSLLKLHQEGDN GESLVVAKMTRTQP
MAFGVLPGLSHSGKNIGIIRSITMANAATHPTAIWILRCLQVKSRDSYNKLVKELDNITK
ETQKNEHKEFVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNHLIDYDLYLTAGPQYSEQALPA
GFFVDRQRNLNNRGKLT YFLDYDIMEGGINTPKMQGNLGFRVKAYPESSDQALAYYRLLD
FHSSLADIHKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISNNLTPAKISGKPTGKKID
```

Abb. 3.16 Aminosäuresequenz des *L. pneumophila* Corby PlaB-Proteins. Kursiv: 15-mer Peptid für die Herstellung des PlaB1 Antikörpers in Kaninchen; unterstrichen: 15-mer und 20-mer Peptide für die Herstellung des PlaB3 Antikörpers in Kaninchen.



### 3.2.3 „Einfache“ Fraktionierung zur membranständigen Lokalisation

Die exponentiell gewachsenen Kulturen von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante und dem *plaB* überexprimierenden Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) wurden durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstandsfraktion wurde mit Isopropanol gefällt, wodurch die enzymatische Aktivität der Enzyme nicht herabgesetzt wird. Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung zerstört und wieder zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Cytosol und das Periplasma (Cytosolfraktion), wobei die Membranen pelletierten (Membranfraktion). Die gelösten Fraktionen wurden in Humanblut-Platten für 2 Tage bei 37°C inkubiert (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17 Lokalisation des PlaB-Proteins.** Die sekretierten Proteine (Überstand), die Zytosol- und Membranfraktion von *L. pneumophila* Corby (LpC Wt), der *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante (LpC *plaB1*) und dem PlaB überexprimierenden Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) (LpC (pKH192)) wurden auf Humanblut-Platten für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Gelbe Höfe zeigen Proteaseaktivität, klare Höfe entstehen durch die Aktivität des PlaB-Proteins. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Der Kontakt der Überstandsfraktionen mit den Erythrozyten führte zu gelben Höfen. Diese entstehen durch proteolytische Aktivitäten. Die stärkste sekretierte proteolytische Aktivität von *Legionella* zeigt die Msp-Protease. Nach Inkubation mit zell-assoziierten hämolytischen Aktivitäten von *Legionella* waren die Hämolysehöfe klar. Der Überexpressionsstamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) bildete nicht nur in der Membranfraktion einen Hämolysehof, sondern auch in der cytosolischen Fraktion. Dies war vermutlich auf die Akkumulation von PlaB im Cytosol zurückzuführen. Das Fehlen der Hämolysehöfe nach Inkubation mit der *plaB*-Mutante verdeutlicht, dass andere zell-assoziierte hämolytische Aktivitäten neben PlaB bei der zweitägigen Inkubation auf Humanblut-Platten keine Rolle spielten. *L. pneumophila*

Corby Wildtyp zeigte in der Membranfraktion, nicht aber in der Cytosolfraction einen Hämolysehof. Somit konnte das hämolytisch aktive PlaB in den Membranen lokalisiert werden, nicht aber im Cytosol der Bakterien. Um die Ergebnisse dieser Fraktionierung zu bestätigen und die innere bzw. äußere Membran getrennt voneinander auf das Vorhandensein des PlaB-Proteins zu untersuchen, wurde eine Sucroседichtegradientenzentrifugation durchgeführt (siehe 3.2.4).

### 3.2.4 Membranfraktionierung durch Sucroседichtegradientenzentrifugation

Um zu klären, ob die PlaB Aktivität in der inneren oder äußeren Membran lokalisiert ist, wurde eine Sucrosegredient-Fraktionierung von *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der *L. pneumophila* Corby *plaB::Km K1* knock-out Mutante durchgeführt. Zunächst wurde das Protokoll auf Basis mehrer Veröffentlichungen optimiert, da sich alle Protokolle unterschieden und erste eigene Versuche nicht zur gewünschten Separation der Membranen führten (Gabay und Horwitz, 1985; Hindahl und Iglewski, 1984; Hindahl und Iglewski, 1986; Osborn et al., 1972; Osborn und Munson, 1974; Roy und Isberg, 1997; Vincent et al., 2006). Dabei stellte sich der Aufschluss durch eine „French pressure cell“ bei geringem Druck, ein Gradient von 55-35% Sucrose und die Benutzung von HEPES-Puffer als optimal heraus.

Nach Aufschluss der exponentiell gewachsenen, pelletierten Bakterien in der „French pressure Cell“ wurden die Lysate auf die in Zentrifugenröhrchen aufgeschichteten Sucrosegredienten aufgetragen. In der darauf folgenden Ultrazentrifugation wurden die Membranen voneinander getrennt. Zum Sammeln der Fraktionen wurden die Zentrifugenröhrchen am Boden angestochen und je 500 µl der austropfenden Flüssigkeit vereinigt. Für die Versuche wurde jede zweite Fraktion analysiert. Zunächst wurde die Trennung der Membranen überprüft. Gleiche Volumina der Sucrosegredientfraktionen wurden in einer SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und in Western Blots mit Antikörpern gegen Markerproteine der inneren und äußeren Membran von *Legionella* analysiert (Abb. 3.18 C). Als Marker für die äußere Membran wurde das „major outer membrane protein“ (MOMP) definiert. Das DotA-Protein ist ein in der inneren Membran sitzender Bestandteil des *dot/icm* Sekretionsapparates von *Legionella* und wurde daher als Marker für die innere Membran verwendet.

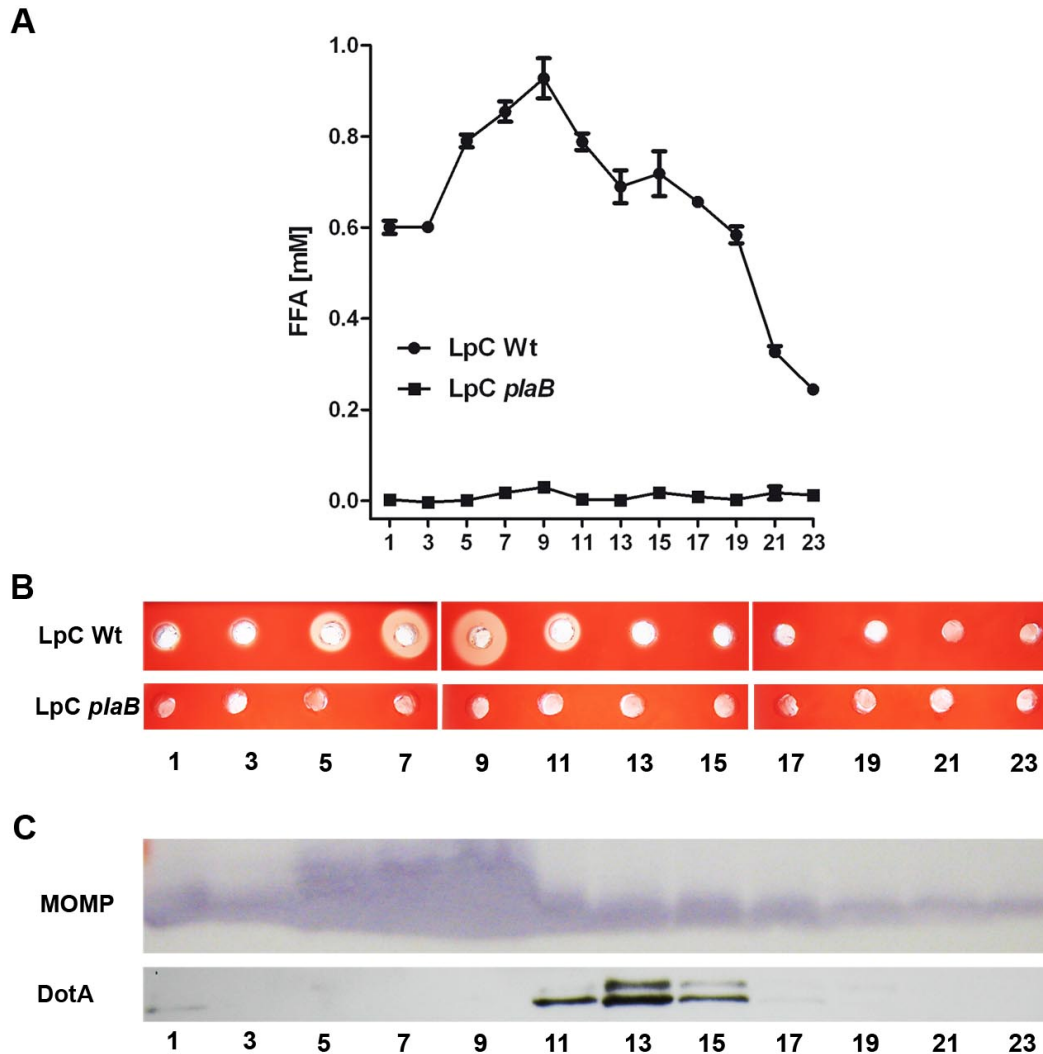


Abb. 3.18 Lokalisation des PlaB-Proteins. *L. pneumophila* Corby und *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 wurden durch Sucrosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Jede zweite Fraktion wurde auf (A) Phospholipase A Aktivität im PLA-Assay und (B) hämolytische Aktivität auf Humanblut-Platten überprüft. Die Fraktionen der äußeren und inneren Membran wurden über (C) Western Blots mit Antikörpern gegen MOMP (Protein der äußeren Membran) und gegen DotA (Protein der inneren Membran) definiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Während das DotA-Protein über eine ECL Detektionslösung auf einem Röntgenfilm detektiert wurde, wurde das MOMP-Protein in einer Farbreaktion direkt auf der Membran sichtbar gemacht. Dies war nötig, da der Primärantikörper fluoreszenzmarkiert war und die Detektion mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper auf Filmen zu einem zu starkem Hintergrund geführt hätte. Das MOMP-Protein war hauptsächlich in den Fraktionen 5 bis 9 zu finden, während das DotA-Protein in den Fraktionen 11 bis 15 vorhanden war (Abb. 3.18 C). Somit konnten die Fraktionen 5-9 als Fraktionen der äußeren Membran und die Fraktionen 11 bis 15 als Fraktionen der inneren Membran definiert werden. Das PlaB-Protein wurde über

seine enzymatische Aktivität indirekt nachgewiesen (Abb. 3.18 A und B). So zeigten die Fraktionen 7 und 9 sowohl die stärkste Aktivität im PLA-Assay als auch die größten Hämolysehöfe. Die parallel durchgeführte Fraktionierung der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante zeigte in keiner Fraktion Hämolyse- oder PLA-Aktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass enzymatisch aktives PlaB-Protein mit der äußeren Membran ko-lokalisiert.

### 3.2.5 Proteinase K-Verdau

Die Membranfraktionierung (siehe 3.2.4) hat gezeigt, dass aktives PlaB eine Lokalisation in der äußeren Membranfraktion aufweist. Um zu zeigen, ob das PlaB-Protein auf der Oberfläche der Bakterien sitzt, wurde ein Proteinase K-Verdau mit ganzen Zellen durchgeführt. Dafür wurden exponentiell gewachsene Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante und der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) Komplementante pelletiert und auf die gleiche Bakteriendichte eingestellt. *L. pneumophila* Corby Wildtyp wurde mit Proteinase K in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K-Aktivität durch Zugabe des Proteinase K-Inhibitors Pefabloc SC (Roche, Mannheim) irreversibel inhibiert und ein PLA-Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurden die *plaB*-Mutante, die *plaB*-Komplementante sowie *L. pneumophila* Corby ohne Proteinase K Inkubation im PLA-Assay eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigte die *plaB*-Mutante im Gegensatz zu Komplementante und Wildtyp keine Aktivität. Bei Inkubation des Wildtyps mit Proteinase K nahm die PLA-Aktivität mit steigender Konzentration der Proteinase K bis auf nahezu null ab (Abb. 3.19). Somit wurde das PlaB-Protein konzentrationsabhängig verdaut und sitzt daher zumindest zum Teil oberflächenexponiert auf der äußeren Membran.

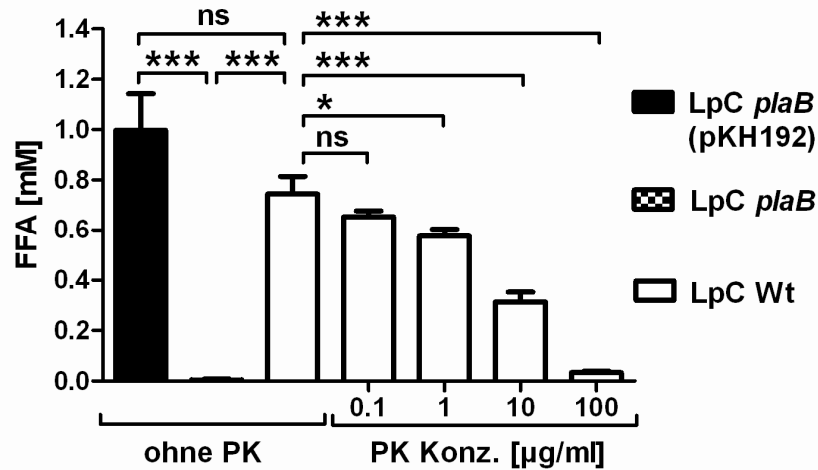


Abb. 3.19 Proteinase K-Verdau von PlaB auf der Oberfläche von *Legionella*. *L. pneumophila* Corby (LpC Wt) wurde mit Proteinase K (PK) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die verbleibende Phospholipase A Aktivität wurde im Vergleich zur Inkubation ohne Proteinase K bestimmt. Als Kontrolle dienten die *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante (LpC *plaB*) und der komplementierende Stamm *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)). Das Experiment wurde in dreifachem Ansatz dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ und stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen eines Experimentes dar. Die statistische Signifikanz wurde durch den „student's t-test“ ermittelt (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns, nicht signifikant) (Prism 5.0).

### 3.2.6 Export von PlaB

Für die Sekretion von Proteinen in *Legionella* sind momentan ein putatives T1SS, das T2SS, das T4SS und ein putatives T5SS bekannt. Die Flagellinmaschinerie kann ähnlich einem T3SS zur Sekretion von Proteinen dienen. Weiterhin sind in *Legionella* sowohl der Sec- als auch der Tat-abhängige Transport über die innere Membran bekannt. Um zu klären, ob die Translokation des PlaB-Proteins über einen dieser Wege stattfindet, wurden exponentiell gewachsene Kulturen verschiedener Sekretionsmutanten in einem Phospholipase A-Assay auf die Freisetzung freier Fettsäuren vom Substrat DPPC durch membranständiges PlaB-Protein untersucht. Dabei wurden ganze Bakterien eingesetzt. Die eingesetzten Stämme waren *L. pneumophila* Corby Wildtyp und die in diesem Stamm hergestellten Mutanten für *lssB* (T1SS), *lspDE* (T2SS) und *tatC* (Tat-abhängiger Transport über die innere Membran) sowie *L. pneumophila* Philadelphia I JR32 und die zugehörige *dot/icm*-Mutante (T4BSS). Weiterhin wurden die *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1-Mutante und der komplementierende Stamm *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) als Kontrolle verwendet.

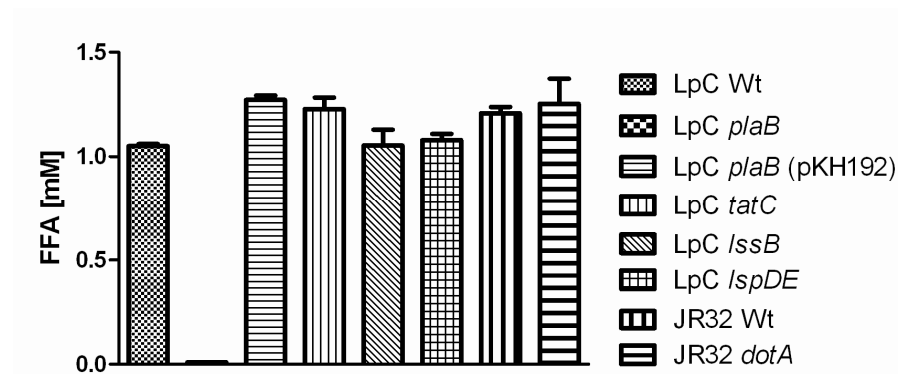


Abb. 3.20 Enzymatische Aktivität des PlaB-Proteins in *L. pneumophila* Sekretionsmutanten. Die Phospholipase A Aktivität ganzer Zellen wurde für *L. pneumophila* Corby (LpC Wt) und dessen Mutanten für die Tat-abhängige Sekretion (*tatC*), des T1SS (*lssB*) und T2SS (*lspDE*), sowie für *L. pneumophila* Phil JR32 (JR32 Wt) und dessen Mutante des T4BSS (*dotA*) untersucht. Als Kontrolle dienten die *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 (LpC *plaB*) Mutante sowie *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)). Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Daten des PLA-Assays wurden in Dreifachansätzen durchgeführt und sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

In allen verwendeten Sekretionsmutanten war die hydrolytische Aktivität des PlaB-Proteins vorhanden. Somit wird das PlaB-Protein wahrscheinlich nicht über das T1SS, das T2SS oder das T4BSS zur äußeren Membran transportiert. Ebenso gelangt das PlaB-Protein anscheinend nicht über die Tat-Maschinerie durch die innere Membran.

### 3.3 Virulenzassoziation von PlaB

#### 3.3.1 Salz-Stresstest

Legionellen der replikativen Phase sind salzresistent, während die transmissive Phase durch Salzsensitivität gekennzeichnet ist. Es konnte gezeigt werden, dass einige avirulente Legionellen weitaus besser auf Nährmedien mit hoher Salzkonzentration wachsen können, als virulente Stämme, da sie nicht salzsensitiv werden (Catrenich und Johnson, 1989).

Durch einen Wachstumstest auf salzhaltigen BCYE-Nährböden sollte getestet werden, ob ein Ausfall des *plaB*-Gens einen Einfluss auf die Salzsensitivität bzw. -resistenz hat. Exponentiell und stationär gewachsene Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante und der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) Komplementante wurden verdünnt und jeweils auf einen BCYE-Nährboden mit und ohne Salz aufgetropft (Abb. 3.21).

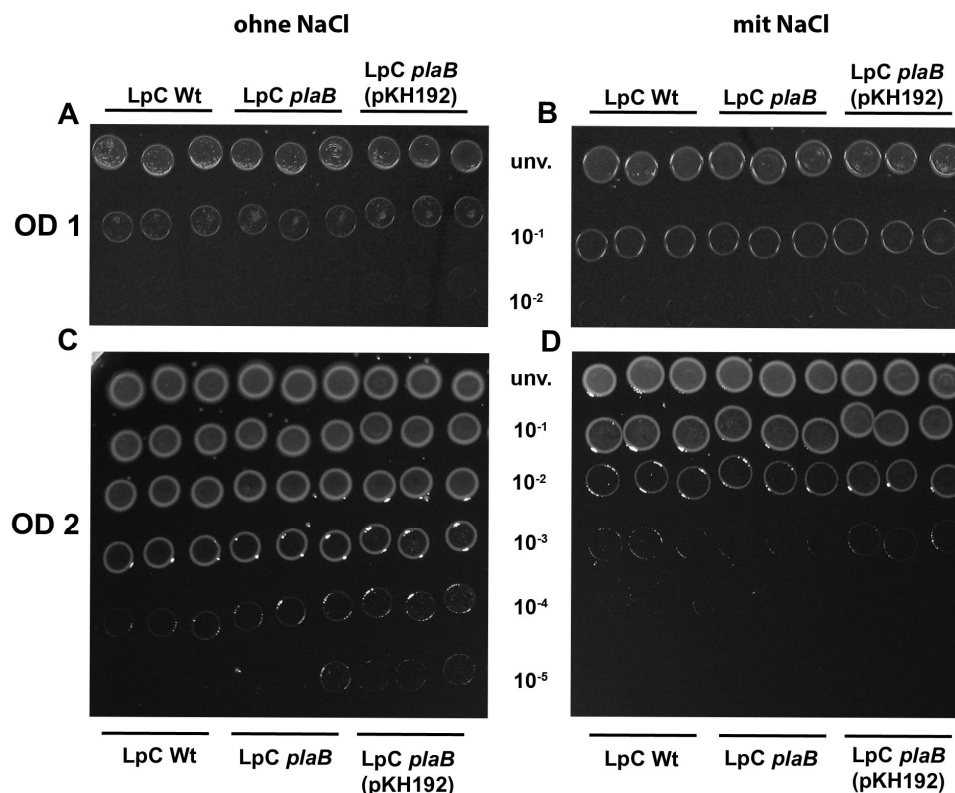


Abb. 3.21 Salz-Stresstest. Exponentiell (A und B) und stationär (C und D) gewachsene Kulturen von *L. pneumophila* Corby (LpC Wt), *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 (LpC *plaB*) und *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)) wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BYCE-Nährböden ohne (A und C) bzw. mit 100mM NaCl (B und D) aufgetropft und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die gezeigten Platten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Die Bakterien der exponentiellen Phase zeigten keinen Unterschied beim Wachstum mit und ohne Salz. Wie erwartet waren die stationär gewachsenen Bakterien salzsensitiv. Dabei verhielt sich die *plaB*-Mutante wie *L. pneumophila* Corby Wildtyp. Somit führt der Verlust von *plaB* nicht zu einer veränderten Empfindlichkeit gegen Salz und es kann nicht auf eine mögliche Virulenzattenuation von *plaB*-defizienten Legionellen geschlossen werden.

### 3.3.2 Verbreitung von PlaB

Weltweit werden die meisten Fälle der Legionärskrankheit durch *L. pneumophila* Sg1 verursacht (siehe Einleitung). Weiterhin werden die verschiedenen Stämme mit einer unterschiedlich hohen Virulenz bewertet, wobei einige eher mit der Legionärskrankheit und andere eher mit dem Pontiac-Fieber in Zusammenhang gebracht werden (Fields et al., 2002; Igel, 2007). Welche Merkmale zu der unterschiedlichen Virulenz führen, ist nicht bekannt. Um sich einen Überblick über die Verbreitung von *plaB* in den verschiedenen *Legionella*-Spezies schaffen zu können, wurden 12 verschiedene *Legionella* Stämme ausgewählt.

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um festzustellen, ob das *plaB*-Gen in den verschiedenen Stämmen vorhanden ist. Da die Sequenzvergleiche gezeigt haben, dass das PlaB-Protein eine hoch konservierte Sequenz besitzt, war wahrscheinlich, dass die anhand der Sequenz von *L. pneumophila* Corby ausgewählten Primer auch an die *plaB*-Sequenz von anderen *Legionella* Stämmen binden. Wie aus Abb. 3.22 A ersichtlich ist, konnte das PlaB-Protein bei allen untersuchten Stämmen außer *L. micdadei* amplifiziert werden. Wie unter 3.1.1 beschrieben, ist im Genom von *L. micdadei* auch keine PlaB-Sequenz vorhanden.

Um zu untersuchen, ob PlaB in den *plaB*-positiven Stämmen auch als enzymatisch aktives Protein vorliegt, wurden exponentiell gewachsene Flüssigkulturen aller 12 Stämme geerntet, durch die Methode der „einfachen Fraktionierung“ Membranfraktionen hergestellt und diese in ausgestanzten Löchern der Humanblut-Platten für zwei Tage bei 37°C inkubiert.

Die Membranfraktionen von *L. pneumophila* Corby #70, *L. hackeliae* Sg 1 #133, *L. pneumophila* 18398/ 98 #139, *L. pneumophila* Corby #143, *L. pneumophila* Philadelphia I #145, LLAP10 #148 und *L. lythica* #153 zeigten einen Hämolysehof. Als Negativkontrolle dienten die *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante und die *L. pneumophila* Corby *plaB*1 Insertionsmutante. Erwartungsgemäß zeigten die *plaB*-Mutanten und *L. micdadei* keinen Hämolysehof. Alle *L. pneumophila*-Stämme waren dagegen hämolytisch. Eine vergleichbare hämolytische Aktivität war für *L. hackeliae*, LLAP und *L. lythica* zu sehen.



*L. erythra*, *L. bozemanii* und *L. longbeachae* zeigten keinen Hof. Somit scheint die membranassoziierte hämolytische Aktivität bei *Legionella pneumophila* Stämmen vergleichbar zu sein, in anderen Stämmen gibt es Unterschiede.

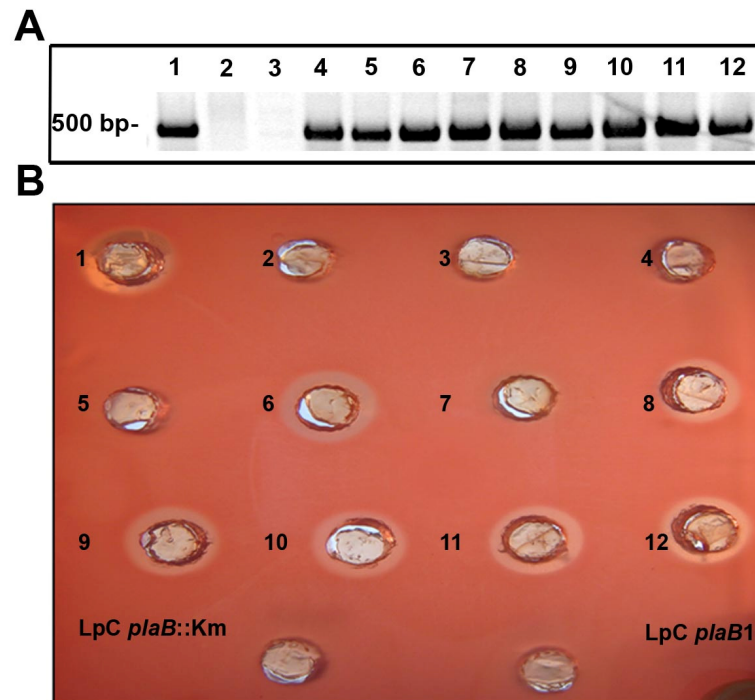


Abb. 3.22 PCR verschiedener *Legionella*-Isolate mit *plaB*-spezifischen Primern und hämolytische Aktivität der Membranfraktionen. (1) *L. pneumophila* Corby #70; (2) *L. micdadei* L01-500 #230; (3) *L. micdadei* W02-539 #231; (4) *L. erythra* #132; (5) *L. bozemanii* #131; (6) *L. hackeliae* SG 1 #133; (7) *L. longbeachae* SG1 #134; (8) *L. pneumophila* 18398/ 98 #139; (9) *L. pneumophila* Corby #143; (10) *L. pneumophila* Philadelphia I # 145; (11) LLAP10 #148; (12) *L. lythica* #153; *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante (LpC *plaB*::Km) und die *L. pneumophila* Corby *plaB1* Insertionsmutante (LpC *plaB1*); M, 1 kb DNA Größenstandard. Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

### 3.3.3 Infektion von *A. castellanii*

*Acanthamoeba castellanii* ist ein natürlicher Wirt von *L. pneumophila*. Darum wurden diese Amöben für Infektionsversuche ausgewählt. Dabei sollte ein möglicher Replikationsdefekt der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante untersucht werden. *A. castellanii* wurde mit einer MOI von 0,01 mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante oder der *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) Komplementante infiziert. Nach einer Inkubation von 24, 48 und 72 h wurden die Amöben lysiert und die bakterielle CFU auf BCYE-Nährböden bestimmt.

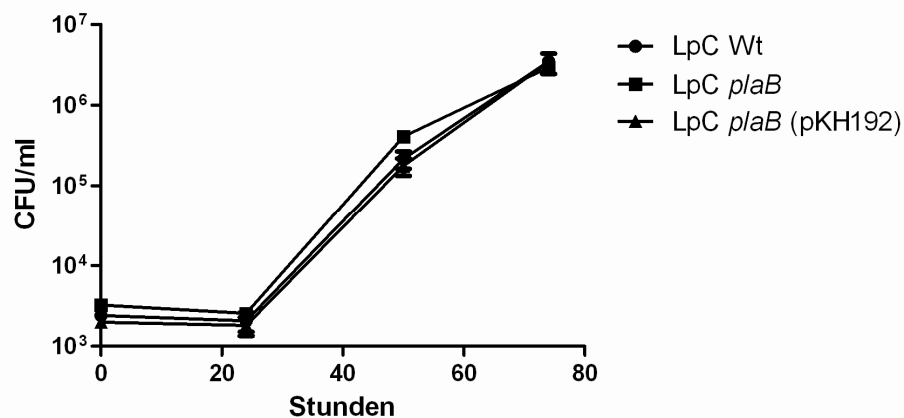


Abb. 3.23 Infektion von *A. castellanii*. Die Infektion mit *L. pneumophila* Corby (LpC Wt), *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 (LpC *plaB*) und *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)) wurde mit einer MOI von 0,01 durchgeführt. Die Anzahl der Bakterien wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Ausplattieren auf BCYE-Nährböden bestimmt. Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Infektion wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die *plaB*-Mutante vermehrte sich in *A. castellanii* genauso wie *L. pneumophila* Corby Wildtyp und *L. pneumophila* Corby *plaB* (pKH192).

In einem weiteren Versuch wurde eine Koinfektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der *plaB*-Mutante durchgeführt, um die Detektion geringer Replikationsdefekte zu ermöglichen. Auch während der Koinfektion replizierten beide Stämme gleich schnell (Daten nicht gezeigt). Somit ist das PlaB-Protein für die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* entbehrlich.

### 3.3.4 Virulenz im Meerschweinchenmodell

#### 3.3.4.1 Untersuchung der Replikation in der Lunge und Infektion der Milz

Um festzustellen, ob das PlaB-Protein eine Rolle für die Etablierung der Legionärskrankheit spielt, wurden Meerschweinchen intratracheal mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Lungen und die Milz entnommen und die Anzahl der Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Nährböden bestimmt. In der Lunge hatte sich die Anzahl der wildtypischen Bakterien um das 400-fache erhöht, wobei die Anzahl der PlaB-defizienten Bakterien nur um das 20-fache erhöht hatte. In der Milz war der Unterschied noch viel deutlicher. Die Anzahl der dort gefundenen wildtypischen Bakterien war vergleichbar mit dem Inokulum, wogegen 100-mal weniger PlaB-defiziente Bakterien in der Milz zu finden waren. Somit hatte die *plaB*-Mutante sowohl einen Replikationsdefekt in der Lunge als auch eine stark eingeschränkte Fähigkeit sich bis in die Milz auszubreiten.

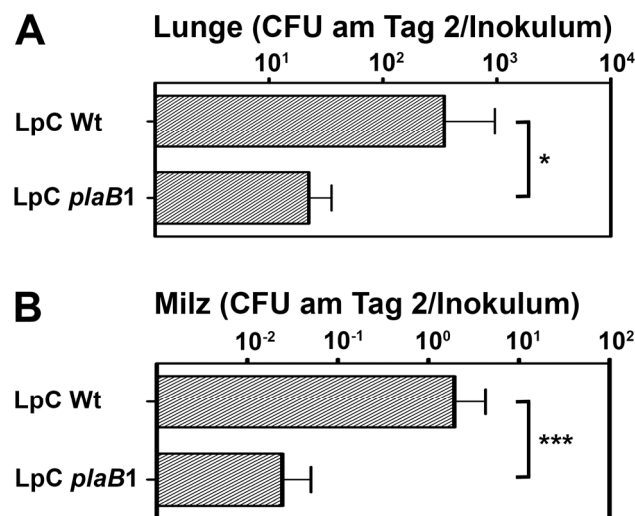
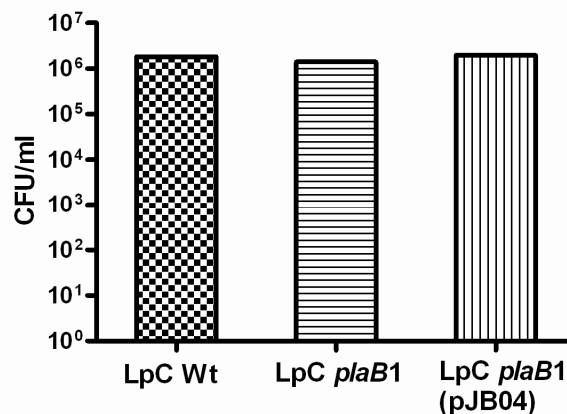


Abb. 3.24 Infektion von Meerschweinchen und CFU-Bestimmung in Lunge und Milz. *L. pneumophila* Corby (LpC Wt) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (LpC *plaB1*) wurden intratracheal in Meerschweinchen injiziert. Nach zwei Tagen wurden Lunge und Milz entnommen, homogenisiert und auf BCYE-Nährböden ausplattiert. Die CFU wurde auf das Inokulum bezogen. Die Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sind als Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Im ersten Versuch wurden jeweils drei Tiere infiziert, im zweiten Versuch jeweils vier Tiere. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test überprüft (\*,  $p=0,0379$ ; \*\*\*,  $p=0,0006$ ).

### 3.3.4.2 Histologie der Lunge

In einem zweiten Experiment wurden Meerschweinchen intratracheal mit *L. pneumophila* Corby (pBCKS), der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pBCKS) Mutante und der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Komplementante infiziert. Das Inokulum wurde ausplattiert, um sicher zu stellen, dass die Tiere mit der gleichen Bakterienmenge infiziert wurden. Die eingesetzte Bakterienmenge betrug  $1,83 \times 10^6$  *L. pneumophila* Corby/ml,  $1,39 \times 10^6$  *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante/ml und  $1,96 \times 10^6$  *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04)/ml und war somit vergleichbar (Abb. 3.27).



**Abb. 3.25 Inokulum für die Meerschweincheninfektion.** *L. pneumophila* Corby (pBCKS) (LpC Wt), *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pBCKS) (LpC *plaB1* (pBCKS)) und *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) (LpC *plaB1* (pJB04)) wurden intratracheal in Meerschweinchen injiziert. Die eingesetzte Bakterienmenge wurde durch Bestimmung der CFU/ml auf BCYE-Nährböden überprüft.

Als Kontrolle diente ein Tier, welches statt der Bakterien eine Injektion von PBS erhielt. Nach einer Inkubationszeit von 40 h wurden die Lungen entnommen, formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet und histopathologischen Untersuchungen unterzogen. Die Lungen des Kontrolltiers zeigten keinen pathologischen Befund. Die Alveolen waren luftgefüllt und es war keine Entzündungsreaktion erkennbar (Abb. 3.26 1a bis 4a).

Die Übersichtsfärbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin und Eosin ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen. Hämatoxylin ist ein natürlicher basischer Farbstoff und wird in dieser Färbung als Hämalaun eingesetzt, um alle sauren Strukturen blau anzufärben. So werden insbesondere die Zellkerne über die DNA und das raue endoplasmatische Retikulum blau gefärbt. Eosin färbt als ein synthetischer saurer Farbstoff die basischen Strukturen rot, also vor allem das Cytoplasma (Weyrauch, 1998). Erythrozyten erscheinen in dieser Färbung rot gefärbt.



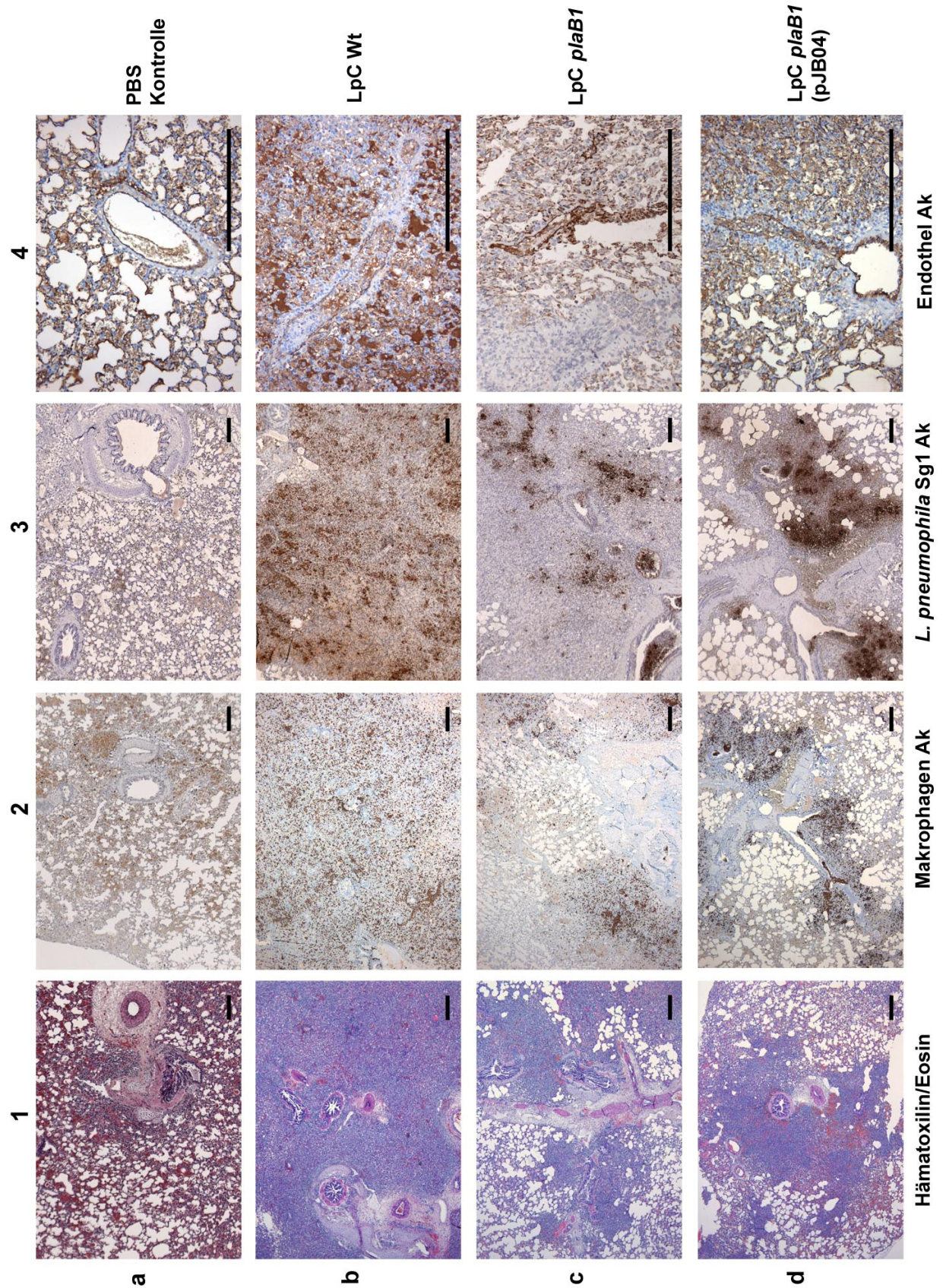


Abb. 3.26 Histopathologie der Meerschweinchenlungen nach Infektion mit *L. pneumophila*. Ein Tier erhielt eine intratracheale Injektion von (a) PBS, jeweils 3 Meerschweinchen wurden mit  $10^6$  Bakterien der Stämme (b) *L. pneumophila* Corby (pBCKS) (LpC Wt (pBCKS)), (c) *L. pneumophila plaB1* (pBCKS) (LpC *plaB1* (pBCKS)) oder (d) *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) (LpC *plaB1* (pJB04)) infiziert. Nach einer 40-stündigen Inkubation wurden die Lungen entnommen und einer (1) Hämatoxilin/Eosinfärbung



oder einer immunohistochemischen Detektion mit Antikörpern gegen (2) Makrophagen, (3) *L. pneumophila* Sg1 oder (4) Endothelstrukturen unterzogen. Nach Infektion mit wildtypischen Legionellen zeigte die (1b) Hämatoxilin/Eosin Übersichtsfärbung eine konfluente Bronchopneumonie. Es befanden sich viele (2b) Makrophagen und (3b) Legionellen im Alveolargewebe. Weiterhin waren die (4b) Endothelstrukturen zerstört. Nach Infektion mit *plaB*-defizienten Legionellen war die Infektion auf (1c) einzelne peribronchiale Bereiche beschränkt. In diesen Bereichen waren (2c) Makrophagen und (3c) Legionellen detektierbar, die (4c) Endothelstrukturen waren nahezu intakt. Eine (1-4d) vollständige Komplementation wurde nicht erreicht. Balken, 200 µm.

Die Lungen der mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp infizierten Tiere zeigten in der Hämatoxilin/Eosinfärbung eine extensive Bronchopneumonie (Abb. 3.26 1b). Die sonst dem Gasaustausch dienenden Alveolen waren gefüllt mit inflammatorischem Infiltrat mit Neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen. Im Gegensatz dazu zeigten die mit der *L. pneumophila* Corby *plaB*-Mutante infizierten Lungen nur eine lokal begrenzte peribronchiale Infektion (Abb. 3.26 1c). Die peripheren und oberen Bereiche der Lungen waren nahezu nicht entzündet. Dieser Befund konnte durch die immunhistochemische Färbung der Alveolarmakrophagen mit dem MAC387 Antikörper bestätigt werden. Während nach der Infektion mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp sehr viele Makrophagen in der gesamten Lunge gezeigt werden konnten, befanden sich nach der Infektion mit der *plaB*-Mutante Makrophagen vorwiegend in den Bronchus-assoziierten Regionen, den Eintrittsorten der Legionellen in das Lungengewebe (Abb. 3.26 2b und c). Weiterhin wurden mittels immunhistochemischer Detektion mit einem Antikörper gegen *L. pneumophila* der Serogruppe 1 mehr Legionellen in den mit dem Wildtyp infizierten Lungen gefunden, als nach der Infektion mit der *plaB*-Mutante (Abb. 3.26 3b und c).

In einer weiteren immunhistochemischen Färbung zur Detektion der Endothelstrukturen wurde der EN4-Antikörper eingesetzt (Abb. 3.26 4). Das Endothel ist ein Bestandteil der Blutgefäße und des Lungenparenchyms. In den mit wildtypischen Legionellen infizierten Lungen waren die Alveolen mit Resten von zerstörtem Endothel gefüllt, während die Lungen nach der Infektion mit der *plaB*-Mutante nahezu intakte Endothelstrukturen aufwiesen (Abb. 3.26 4b und c).

Die verminderte Inflammation und Endothelzerstörung in den Lungen, sowie der Replikationsdefekt der *plaB*-Mutante konnte nur teilweise komplementiert werden (Abb. 3.26 1d bis 4d). Eine Ursache dafür könnte der Verlust des Komplementationsvektors sein. Um zu überprüfen, ob die injizierten Stämme *L. pneumophila* Corby Wildtyp, die *plaB1* Mutante und die Komplementante die Plasmide enthielten und ob diese Plasmide nach der 40-stündigen Infektion noch vorhanden waren, wurde eine PCR mit dem Inokulum und re-isolierten Legionellen durchgeführt (Abb. 3.22).

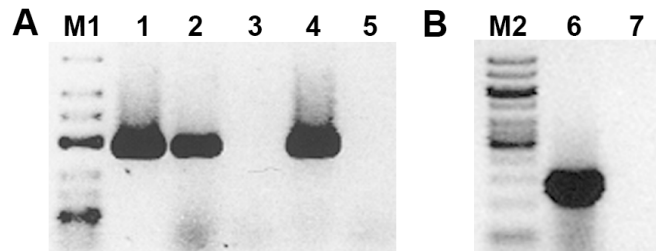


Abb. 3.27 PCR des Inokulums und der re-isolierten Stämme mit Vektor-spezifischen Primern. Für die PCR wurden gleiche Mengen von auf BCYE-Nährböden gewachsenen Bakterien des Inokulums und der re-isolierten Stämme verwendet. Die Primer M13-U/R amplifizieren die „multiple cloning site“ des Vektors pBCKS und wurden daher zum Nachweis der Vektoren verwendet. Spur 1, Positivkontrolle Plasmid pBCKS; Spuren 2,4,6 Inokulum; Spuren 3,5,7 nach 40 h re-isolierte Bakterien; Spur 2 und 3 *L. pneumophila* Corby pBCKS; Spur 4 und 5 *L. pneumophila* Corby *plaB1* pBCKS, Spur 6 und 7 *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04); M1, low range DNA Größenstandard; M2, 1 kb DNA Größenstandard. Die Proben 1-5 wurden (A) auf ein 3%iges Gel aufgetragen, die Proben 6 und 7 wurden (B) auf einem 0,9% Gel analysiert.

*L. pneumophila* Corby Wildtyp und die *plaB1* Mutante des Inokulums trugen den Leervektor und bei der Komplementante war das komplementierende Plasmid vorhanden. Dagegen konnten bei den re-isolierten Stämmen weder der Leervektor noch der komplementierende Vektor nachgewiesen werden (Abb. 3.27). Zur weiteren Überprüfung wurden re-isolierte Bakterien aus den mit *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) infizierten Lungen auf Chloramphenicol-haltigem BCYE-Nährböden ausgestrichen (Abb. 3.28).

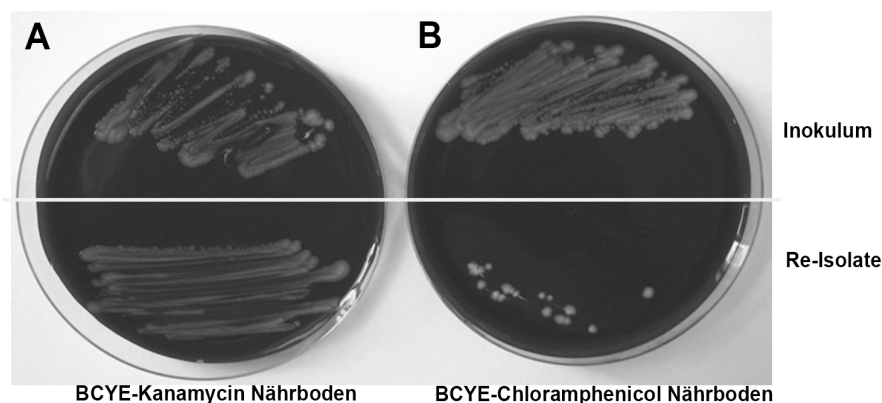


Abb. 3.28 Kolonienwachstum von *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04). Das Inokulum des komplementierenden Stamms *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) und die aus den Meerschweinchen re-isolierten Bakterien wurden auf BCYE-Nährböden kultiviert und dann in vergleichbarer Menge auf Nährböden mit (A) Kanamycin bzw. (B) Chloramphenicol ausgestrichen.

Sowohl die Ergebnisse der PCR als auch das nicht vorhandene Wachstum der Re-Isolate auf den Chloramphenicol-haltigen Nährböden zeigten, dass die Mehrzahl der *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) Stämme ihr Plasmid nach der zweitägigen Infektion verloren hatten.

### 3.3.5 Rolle der *Legionella*-Virulenzfaktoren Flagellin, Msp und Mip

Die hauptsächlich aus Flagellin (FlaA) aufgebaute Flagelle, die Msp-Protease und der „macrophage-infectivity potentiator“ (Mip) gelten als Virulenzfaktoren von *Legionella*. Die Flagelle ist einerseits wichtig für die Invasion in Wirtszellen, andererseits erkennt das angeborene Immunsystem das Flagellin über cytosolische Rezeptoren, was zur Aktivierung der Immunabwehr und zum Tod der infizierten Zelle führen kann (Dietrich et al., 2001; Lightfield et al., 2008; Vinzing et al., 2008). Mutanten der Msp-Protease und des Mip-Proteins sind im Meerschweinchenmodell virulenzattenuiert (Moffat et al., 1994; Wagner et al., 2007). Da das Aussehen der Lungen nach Infektion mit diesen Mutanten dem in dieser Arbeit beschriebenen pathohistologische Bild nach der Infektion mit *plaB*-defizienten Legionellen ähnelte, wurde die *plaB*-Mutante auf ein verändertes Expressionsmuster von Msp und Mip untersucht. Um zu klären, ob die *L. pneumophila* Corby *plaB*-Mutanten noch Msp-Protease Aktivität besitzen, wurden ganze Bakterien auf Caseinagar ausplattiert (Abb. 3.29 A).

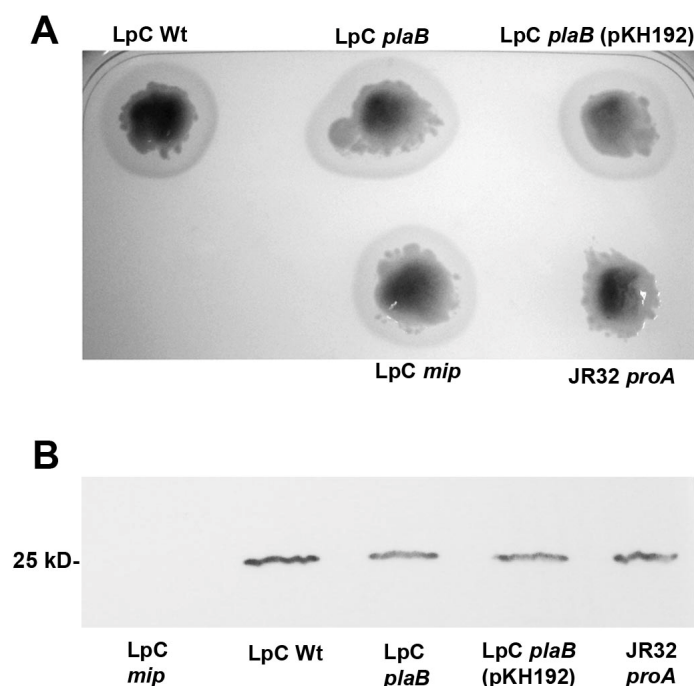
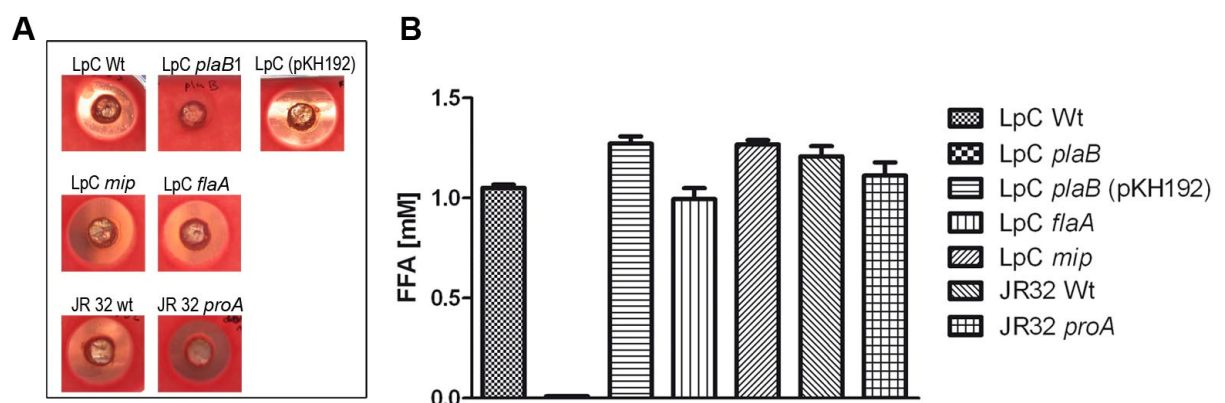


Abb. 3.29 Einfluß einer Mutation in *plaB* auf Virulenzfaktoren Mip und Msp. Die *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 knock-out Mutante (LpC *plaB*) wurde (A) auf *Legionella*-Caseinagar kultiviert und (B) in einem Western Blot mit einem Mip-spezifischen Antikörper untersucht. Als Kontrolle dienen *L. pneumophila* Corby (LpC Wt) und *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)) sowie die *L. pneumophila* Corby *mip* (LpC *mip*) und die *L. pneumophila proA* (JR32 *proA*) Mutanten.



Die *plaB*-Mutante zeigte ebenso einen Proteolysehof wie *L. pneumophila* Corby Wildtyp, *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) und die *L. pneumophila* Corby *mip*-Mutante, während nur die *proA*-Mutante keinen Hof bilden konnte. Somit beeinflusst PlaB nicht die sekretierte proteolytische Msp-Aktivität von *Legionella*.

Um festzustellen, ob eine Mutation im *plaB*-Gen Auswirkungen auf die Expression des Mip-Proteins hat, wurden *L. pneumophila* Corby, *L. pneumophila plaB*::Km K1, *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km K1 (pKH192) und die *L. pneumophila* Corby *mip*-Mutante von der BCYE-Nährbodenplatte in PBS pH 7,4 überführt und auf die OD<sub>600</sub>=2 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 20 µl mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot auf die Expression von Mip hin untersucht (Abb. 3.29 B). Dazu wurde der Mip-spezifische Mausantikörper 2D8 in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Der Sekundärantikörper wurde in der Konzentration 1:5000 eingesetzt. Das Mip-Protein konnte in allen Stämmen außer der *mip*-Mutante in vergleichbaren Mengen detektiert werden und wird daher unabhängig von dem Vorhandensein des PlaB-Proteins exprimiert. Somit ist die im Meerschweinchenmodell beobachtete Virulenzattenuation der *plaB*-defizienten Legionellen nicht auf die fehlende Expression der Msp-Protease oder des Mip-Proteins zurückzuführen. Desweiteren wurde überprüft, ob *flaA*, *msp* und *mip* Einfluss auf die Aktivität des PlaB-Proteins haben. Dazu wurden Hämolyse-Assays und PLA-Assays mit den *L. pneumophila* Corby Mutanten für *flaA*, *proA* (Msp) und *mip* durchgeführt.



**Abb. 3.30** Enzymatische Aktivität des PlaB-Proteins in Mutanten einiger *L. pneumophila* Virulenzfaktoren. Die hämolytische Aktivität von Membranfraktionen (A) und Phospholipase A Aktivität ganzer Zellen (B) wurde für *L. pneumophila* Corby (LpC Wt) und dessen Mutanten für die *Legionella*-Virulenzfaktoren Mip (LpC *mip*), und des Flagellins (LpC *flaA*) sowie für *L. pneumophila* PhilI (JR32 Wt) und dessen Mutante der Msp-Protease (JR32 *proA*) bestimmt. Als Kontrolle dienten die *L. pneumophila* Corby *plaB1* (LpC *plaB1*) und *plaB*::Km K1 (LpC *plaB*) Mutante sowie *L. pneumophila* Corby (pKH192) (LpC (pKH192)) und *L. pneumophila* Corby *plaB*::Km (pKH192) (LpC *plaB* (pKH192)). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Der PLA-Assay wurde in Dreifachansätzen durchgeführt, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Alle drei Mutanten zeigten sowohl *plaB* spezifische Hämolyse als auch PLA-Aktivität. Somit haben auch unflagellierte Legionellen PlaB auf ihrer Oberfläche. Weiterhin wird PlaB nicht durch die Msp-Protease aktiviert. Außerdem arbeitet PlaB unabhängig von einem weiteren Virulenzfaktor in *Legionella*, dem Mip-Protein.

## 4 Diskussion

### 4.1 Transkriptionsrate und enzymatische Aktivität von PlaB

#### 4.1.1 *In silico* Analysen

Das PlaB-Protein von *Legionella* zeigt ausschließlich Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen (Flieger et al., 2004). Die größten Übereinstimmungen ergeben sich zu hypothetischen Phospholipasen aus *Psychromonas ingrahamii*, *Mariprofundus ferrooxydans*, *Desulfuromonas acetoxidans* und *Shewanella pealeana*. Somit ist es nicht möglich durch Homologien zu anderen Proteinen Aussagen über die Sekretion, Lokalisation, 3D-Struktur, Funktion und physiologische Bedeutung zu treffen.

Der Vergleich der verfügbaren PlaB-Sequenzen von *Legionella* hat gezeigt, dass dieses Protein sowohl innerhalb der *L. pneumophila*- als der non-*pneumophila* Stämme hoch konserviert ist. Dies wird auch im Vergleich zu dem als hochkonserviert beschriebenen Mip-Protein deutlich. Die Identität des Mip-Proteins liegt bei den *L. pneumophila*-Stämmen geringfügig höher als für das PlaB-Protein, der Vergleich der non-*pneumophila* Stämme ergab für das PlaB-Protein eine etwas höhere Identität als für das Mip-Protein. Das *mip*-Gen ist in allen bisher bekannten *Legionella* Stämmen vorhanden und wird deshalb in der Diagnostik zur Identifikation von *Legionella*-Isolaten inklusive der Serogruppe verwendet. Dazu werden die am höchsten konservierten Bereiche des *mip*-Gens amplifiziert (siehe 1.6). Obwohl das Mip-Protein ein wichtiger Virulenzfaktor von *Legionella* ist, bestehen zwischen Umwelt- und Patientenisolaten keine wesentlichen Unterschiede in der *mip*-Sequenz (Ratcliff et al., 1997; Ratcliff et al., 1998). Somit kann von der Verbreitung eines Gens nicht auf seine Bedeutung für die Pathogenität der Bakterien geschlossen werden. Weiterhin müssen hochkonservierte Gensequenzen auch nicht phylogenetisch begründet sein, da diese Gene auch durch horizontalen Gentransfer oder Selektionsdruck weit verbreitet sein können. Dies erkennt man auch daran, dass die aufgrund einzelner Gene aufgestellten phylogenetischen Stammbäume nicht mit den durch Abgleich der 16s RNA erstellten phylogenetischen Stammbäumen überein stimmen (Ratcliff et al., 1997).

Innerhalb der *L. pneumophila*-Stämme ist *plaB* von den gleichen Nachbarschaftsgenen umgeben, wobei sich das *plaB*-Gen in den non-*pneumophila* Stämmen in einer völlig anderen Umgebung befinden. Das *plaB*-Gen könnte durch horizontalen Gentransfer zwischen den/auf

die non-*pneumophila* Stämme übertragen worden sein. Kürzlich wurde gezeigt, dass *Legionella* genomische Inseln auf andere *Legionella*-Spezies übertragen kann (Glöckner et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten *in silico* Analysen haben allerdings keinen Hinweis darauf ergeben, dass das *plaB*-Gen auf einer solchen Insel liegen könnte. Somit bleibt der Ursprung der festgestellten hohen Identität von PlaB in verschiedenen *L. pneumophila* als auch non-*pneumophila* Stämmen unbekannt. Die weite Verbreitung und hohe Homologie lässt aber auf ein für *Legionella* „wichtiges“ Gen schließen.

In der Literatur wurde eine Ähnlichkeit des PlaB-Proteins zu dem OMPLA-Protein diskutiert (Banerji et al., 2008; Flieger et al., 2004). Das PlaB-Protein ist hämolytisch, eine PLA/LPLA und *plaB*-defiziente Mutanten zeigen keinen Replikationsdefekt in Zellkulturexperimenten (Bender und Flieger, 2009 (in press); Flieger et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das enzymatisch aktive PlaB-Protein auf der oberflächenexponierten Seite der äußeren Membran liegt (siehe 3.2). Die „outer membrane phospholipase A“ (OMPLA) ist ein Virulenzfaktor in vielen humanpathogenen Bakterien, so auch in *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Helicobacter* und *Neisseria* (Istivan und Coloe, 2006). OMPLA ist neben seiner PLA/LPLA Aktivität ebenso wie PlaB als hämolytisch beschrieben worden (Snijder und Dijkstra, 2000). Unter Laborbedingungen ist OMPLA nicht essentiell für die Bakterien, Mutanten zeigen genauso wie *plaB*-Mutanten keinen Replikationsdefekt in Zellkulturexperimenten. Weiterhin ist OMPLA ein integrales Protein der äußeren Membran, welches kalziumabhängig als Dimer arbeitet. Es wird aktiviert, wenn die Membranintegrität zerstört wird. Die physiologische Rolle von OMPLA konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Es wird vermutet, dass das Enzym durch seine PLA Aktivität die Durchlässigkeit der äußeren Membran durch den Anteil von Lysophospholipiden in der Membran steigern kann und so die semispezifische Sekretion von Substraten steuert (Dekker, 2000; Snijder und Dijkstra, 2000). Da für OMPLA die katalytisch wichtigen und konservierten Aminosäuren bekannt sind, konnte ein Abgleich mit der Sequenz des PlaB-Proteins durchgeführt werden (Brok et al., 1998; Istivan und Coloe, 2006) (Abb. 4.1).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Ecoli      -----
Shigella   -----
Yersinia   -----
Campylobacter -----MKNINKNNAIKTAIFVVF 18
Helicobacter -----
Legionella MIVIFVHGWSVTHNTYTGELPQWLENQSKQKLDIQVGNILGRYISFDDTVTVDIARA 60

Ecoli      -----MRTLQGWLLPVFMLP--MAVYAQEATVKEVHDAPAVRGSIIANMLQEH 46
Shigella   -----MRTLQGWLLPVFMLP--MAVYAQEATVKEVHDAPAVRGSIIANMLQEH 46
Yersinia   -----MARFWQILIALLLVP--TLAQAEATIEKIHDAPAVRGSIIAAMLQDH 46
Campylobacter FSLDLFGGASELFKKAQQLSAGDTAG--AMKFYKEA AKAAMEQNDAALTONLENEISQG 76
Helicobacter -----MNKWCMLYLSVG--LSSAFADSLPNNLITHSQEK-----ENK 35
Legionella FDQAVRDEIADKL RDGQRFACITHSTGGPIVRKWM DLYFKSNLAKCPLSHLIM LAPANHG 120

Ecoli      DNPFTLYPYDTNYLIYTQTS DLNKEAIASY-----DWAENARKD----- 85
Shigella   DNPFTLYPYDTNYLIYTQTS DLNKEAIASY-----DWAENARKD----- 85
Yersinia   DNPFTLYPYDTNYLIYTQTS DLNKEAIASY-----DWAENARKD----- 85
Campylobacter SPIQANYPVKPEPSSNKSESNLEKVASDPLGIKLYHFNYLLPATYAKNVPNDG-----R 130
Helicobacter KPYLLLYPHNAVYILPFYHSLSEPTPSQSA-----YKNKD----- 70
Legionella SALAQLGKSRLGRIKSFFIEPGKCVLDWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGVYSFVL 180

Ecoli      ---EVKFQLSLAFPLWRGILGPN----SVLGASYTQKSWWQLSNSEESSPFRETNYEPQ 137
Shigella   ---EVKFQLSLAFPLWRGILGPN----SVLGASYTQKSWWQLSNSEESSPFRETNYEPQ 137
Yersinia   ---EVKFQLSLAFPLWRGILGPN----SVLGASYTQKSWWQLSNSEESSPFRETNYEPQ 137
Campylobacter KRFE TKFQFSVQKPLFYDVWGLK----ESIGIAYSQTSWWQT--DKISAPFRETNYRPE 183
Helicobacter --TEIKFQFSFKLAVFNE LFS PY----GYFYFAYTQTAWFQSYNQADSRPFRD VDYQPE 123
Legionella TGQKIDRQFYDAVNSYTGESGSDGVVRVAATNMNYSLLKLHQEGDNGESLVVAKMTRTQP 240
      : . *:      :      :      :      :      :      :      :

Ecoli      LFLGFATDYRFAGWTLRDVEMGYNHDSNGR-----SDPTSRSWNRLYTRLMAEN- 186
Shigella   LFLGFATDYRFAGWTLRDVEMGYNHDSNGR-----SDPTSRSWNRLYTRLMAEN- 186
Yersinia   LFLAWSTDYELAGWTFREVEFGFNHQSNKG-----ADPTSRSWNRYTRVMAQR- 186
Campylobacter IFIDFDTKDSLKAAHISNVRGGILHESNGR-----DGENSRSWNRLYLQAKFD F- 232
Helicobacter LFYSYERPI SFLGGSFKNI SLGYNHISNGE-----RALRSRTQNRILLNMRWEYD 173
Legionella MAFGVL PGLSHSGKNIGIIRSITMAMAA THPTAIWILRCLQVKSRD SYNKL VKELDNITK 300
      :      :      :      :      :      :      :      :

Ecoli      ----GNWLVEVKP WYVVGNTD-----DNPDITKYMGY YQLKIGYHLGDAVL 228
Shigella   ----GNWLVEVKP WYVVGNTD-----DNPDITKYMGY YQLKIGYHLGDAVL 228
Yersinia   ----GNLEIDLKP WYRIPESDS-----KDDNPDITKYMGY YRLKVGYALGDSVF 231
Campylobacter ----ANLSLTPRIWTVIDDKS-----DNKNIE NYAGRADINIAFTYKEQIF 274
Helicobacter IAPQSVFGIKLGAUWVYIGKHLDG-----FMADNPDLALYRGYNDIGLYYKSNRNL 224
Legionella ETQKNEHKE FVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNHLIDYDLYLTAGPQYSEQALPA 360
      .      .      .      .      .      .      .      :

Ecoli      SAKGQYNWN-----TG YGGAE LGLSY PITKH-VRLYTQVYSGYGESLIDYN---- 273
Shigella   SAKGQYNWN-----TG YGGAE LGLSY PITKH-VRLYTQVYSGYGESLIDYN---- 273
Yersinia   SLDGRYNWN-----TG YGGAE MGWSY PITKH-VRFYTQVFSGYGESMIDYN---- 276
Campylobacter NLMVRNNLQFDK-----TNRGAAE FSWLFPILSSGLYGYLQYFNGYDES LIDYN---- 323
Helicobacter ELYMRPPIAR-----RYYPYFELGYTLRASDN-IGIYIQYINGYGDNMFEYK---- 270
Legionella GFFVDRQRNLNNRGKLT YFLDYDIMEGGINTPKMQGNL GFRVKAYPESDQALAYRLLD 420
      * .      .      :      :      :      :      :

Ecoli      -----FNQTRVG VGVMLNDLF----- 289
Shigella   -----FNQTRVG VGVMLNDLF----- 289
Yersinia   -----FRQTRVG VGI MLNDVL----- 292
Campylobacter -----SHTNKIGIGFTLLK----- 337
Helicobacter -----MRSERIG VGFRLWDK----- 285
Legionella FHSSLADIHKI LHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRI SNNLT PAKIS GKPTGKKID 474

```

Abb. 4.1 Sequenzabgleich bekannter OMPLA Proteine mit *L. pneumophila* Corby PlaB (ClustalW). Die OMPLA-Sequenzen stammen aus *E. coli* K12, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter curvus* und *Helicobacter hepaticus*, die Sequenz des PlaB-Proteins aus *L. pneumophila* Corby. Der Sequenzbereich mit den katalytisch wichtigen und konservierten Aminosäuren ist fett gedruckt.

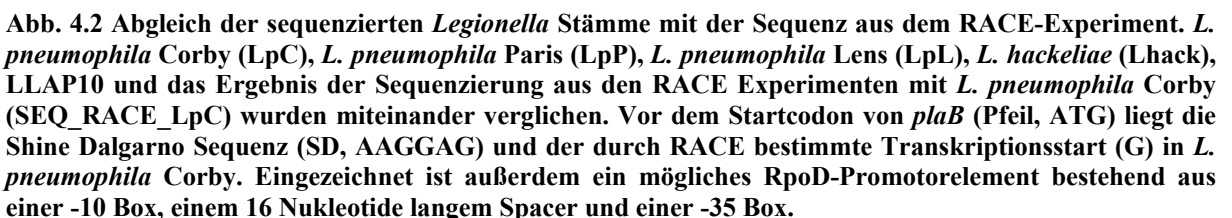
Das PlaB-Protein besitzt nicht die katalytisch wichtigen Aminosäuren des OMPLA-Proteins. Daher kann man hier nur von funktionell aber nicht mechanistisch ähnlichen Proteinen sprechen.

In einer parallel zu dieser Arbeit angefertigten Dissertation konnte das katalytische Zentrum des PlaB-Proteins bestimmt werden (Bender, 2009; Bender et al., 2009). PlaB besitzt eine katalytische Ser<sup>85</sup>-Asp<sup>203</sup>-His<sup>251</sup> Triade in der N-terminalen Hälfte des Proteins (siehe multipler Sequenzabgleich verschiedener PlaB-Proteine im Anhang). *In silico* Abgleiche zeigten, dass die katalytisch aktiven Aminosäuren in allen bekannten PlaB-Proteinen und im N-terminalen Bereich homologen Proteinen vorkommen. Sie sind in konservierte, aber bisher nicht bekannte Motive eingebettet. Deshalb wurde das PlaB-Protein als erster Vertreter einer bisher unbekannten Lipasefamilie definiert (Bender et al., 2009). Die Funktion des C-Terminus ist weiter unbekannt. Dennoch hat er eine wichtige Funktion, da durch die Insertion einer Resistenzkassette in den C-terminalen Bereich keine PLA/LPLA oder hämolytische Aktivität mehr messbar ist (Flieger et al., 2004). Selbst der Verlust von den C-terminalen 15 Aminosäuren führt bereits zu einem funktionslosen Protein (Bender et al., 2009).

#### 4.1.2 Bestimmung des Transkriptionsstarts

In Bakterien wird die Genexpression vorwiegend auf Transkriptionsebene reguliert. Unter anderem binden Sigma-Faktoren an die -10 und -35 Box des Promotors und ermöglichen so die Transkription durch die RNA-Polymerase (Murakami und Darst, 2003). Wie stark ein Promotor ist, d.h. wie häufig ein Gen transkribiert wird, hängt von der Promotorsequenz und der Konformation der DNA in dieser Region ab (Helmann und Chamberlin, 1988; Wosten, 1998). Abweichungen von den Konsensussequenzen führen generell zu schwächeren Promotoren (Dombroski et al., 1992; Moyle et al., 1991; Voskuil et al., 1995). Schwächere Promotoren entstehen ebenfalls durch eine Verkürzung oder Verlängerung des Spacers, welcher zwischen der -10 und der -35 Box liegt (Ayers et al., 1989). Bakterielle RpoD  $\sigma$ -Faktoren sind notwendig für das exponentielle Wachstum und haben die -35 Konsensussequenz TTGACA, einen Spacer von 17 Nukleotiden und eine -10 Konsensussequenz TATAAT (Ayers et al., 1989; deHaseth et al., 1998). Wichtig scheinen die -10,-12,-36 und -38 Nukleotide zu sein (Ring et al., 1996; Siegele et al., 1989; Waldburger et al., 1990). Bakterielle RpoS  $\sigma$ -Faktoren regulieren die Genexpression in der stationären Phase. Die -10 Konsensussequenz ist TGN<sub>0-2</sub>C(C/T)ATA(C/A)T. Es scheint keine

Die RACE-Experimente ermöglichten die Bestimmung des Transkriptionsstartes von PlaB.



118

quantitative Bestimmung der PLA/LPLA und hämolytischen PlaB Aktivität bestätigt werden könnte. Die Regulation der *plaB*-Transkription durch den RpoN  $\sigma$ -Faktor ist unwahrscheinlich, da keine der Konsensussequenz ähnelnde Nukleotidabfolge vor dem Transkriptionsstart von *plaB* vorliegt.

Die phasenspezifische Genexpression von *Legionella* wird hauptsächlich durch den alternativen Sigmafaktor RpoS, das Zweikomponentensystem LetA/LetS, CsrA, LetE und FliA reguliert (Bachman und Swanson, 2001; Bachman und Swanson, 2004; Rasis und Segal, 2009). Die Expression von RpoS sinkt von der exponentiellen zur stationären Phase ab und reguliert die Expression der anderen Faktoren (Bachman und Swanson, 2004; Hovel-Miner et al., 2009). Broich et al. haben gezeigt, dass die zell-assoziierte Phospholipaseaktivität von *Legionella pneumophila* JR32 sowohl in *letA*- als auch in *rpoS*-Mutanten vermindert ist (Broich et al., 2006). Somit ist davon auszugehen, dass die Transkription von *plaB* auf direktem oder indirektem Weg positiv durch RpoS reguliert wird. Da sich die Konsensussequenzen der RpoS und RpoD  $\sigma$ -Faktoren sehr ähneln, ist es schwierig anhand der Sequenz abzulesen, welcher  $\sigma$ -Faktor an den Promotorbereich schwach transkribierter Gene bindet. Das Cytosin an Position -13 kommt bei 70% der untersuchten RpoS-abhängigen Promotoren vor. An der -13 Position vor dem durch RACE bestimmten *plaB*-Transkriptionsstart steht tatsächlich ein Cytosin. Allerdings ist kein TG Motiv vorhanden und die weitere Sequenz weicht um zwei Nukleotide von der Konsensussequenz ab. Wie auch beim Vergleich der möglichen RpoD Sequenz unterscheiden sich die Sequenzen der *L. pneumophila* und der non-*pneumophila* Stämme.

Somit kann aus den bisherigen Ergebnissen allein nicht festgelegt werden, welcher  $\sigma$ -Faktor die Transkription von *plaB* initiiert. Die von Broich et al. gezeigte verminderte PlaB-Aktivität in *rpoS*-Mutanten könnte auf einen indirekten Effekt zurückzuführen sein (Broich et al., 2006). Die Frage, ob es sich um eine direkte oder indirekte Regulation von *plaB* handelt, könnte über eine RT-PCR mit *rpoS*-Mutanten überprüft werden.

#### 4.1.3 Wachstumsphasen-spezifische Expression

*Legionella* besitzt einen biphasischen Lebenszyklus. Dieser kann auch beim Wachstum in Flüssigmedium untersucht werden. Das exponentielle Wachstum entspricht der replikativen Phase. Bei Nährstoffmangel geht *Legionella* in die stationäre, transmissive Phase über.



Um die Transkriptionsrate und enzymatische Aktivität des PlaB-Proteins im Verlauf des Wachstums zu analysieren, wurden *L. pneumophila* Corby Wildtyp, die *L. pneumophila* Corby *plaB1* Mutante, die *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pKH192) Komplementante und der PlaB überexprimierende Stamm *L. pneumophila* Corby (pKH192) in Flüssigmedium angezogen und Proben über die Wachstumsphasen hinweg entnommen. Die „Reverse Transcription PCR“ (RT-PCR) mit RNA von *L. pneumophila* Corby zeigte, dass die Transkriptionsrate des *plaB*-Gens von der exponentiellen zur stationären Phase sinkt und bereits während des exponentiellen Wachstums gering ist. *In vitro* Microarrays von *L. pneumophila* Paris geben ebenfalls einen Hinweis auf eine eher frühe Expression von *plaB* (Brüggemann et al., 2006). Eine geringe Transkriptionsrate wurde bereits bei der Untersuchung der *plaB*-Promotorregion vermutet, da die Sequenz stark von den bekannten Konsensussequenzen abweicht (siehe 4.1.3). Weiterhin lässt eine geringe Transkriptionsrate auf eine geringe Proteinmenge schließen, was erklären würde, warum das PlaB-Protein in wildtypischen Legionellen mittels Antikörpern nicht detektiert werden konnte (siehe 4.2.1).

Wie bereits bekannt war, hat PlaB eine sehr starke hämolytische und PLA/LPLA Aktivität (Flieger et al., 2004). Die starken enzymatischen Aktivitäten stehen im Kontrast zu der schwachen Transkriptionsrate von PlaB. Dieses Muster ist ebenfalls charakteristisch für sekretierte PLA Aktivitäten von *Legionella* (Flieger 2001). So hat *L. steigerwaltii* hohe sekretierte PLA und LPLA Aktivitäten, wobei nur geringe Proteinmengen im Überstand vorkommen.

Übereinstimmend mit der von der exponentiellen zur stationären Phase sinkenden Transkriptionsrate wurde die stärkste hämolytische und PLA Aktivität in der exponentiellen Wachstumsphase detektiert. Auch für sekretierte Proteasen, Phosphatasen, PLA und LPLA von *L. pneumophila* wurde die Aktivität in verschiedenen Phasen bestimmt. Diese Enzyme erreichten ihre maximale Aktivität beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, weshalb eine mögliche Funktion beim Übergang der Bakterien in die stationäre Phase vermutet wurde (Flieger et al., 2001). Somit liegt die Bedeutung der sekretierten hydrolytischen Aktivitäten und zell-assoziierten PLA eher in der replikativen als in der stationären Phase.

Während die PLA Aktivität des PlaB-Proteins in der post-exponentiellen Phase noch detektierbar war, zeigten die Humanblut-Platten zu diesem Zeitpunkt keinen Hämolysehof mehr. Diese Beobachtung kann mit der höheren Sensitivität des PLA-Assays erklärt werden.

## 4.2 Enzymatisch aktives PlaB ist mit der äußeren Membran assoziiert

### 4.2.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

In dieser Arbeit wurde PlaB-Protein indirekt über die enzymatische Aktivität detektiert. Der Nachweis über die Aktivität ist möglich, da das PlaB-Protein die einzige starke membran-assoziierte hämolytische Aktivität und PLA/LPLA von *L. pneumophila* Corby ist. Der indirekte Nachweis von PlaB hat den Nachteil, dass nur Aussagen über enzymatisch aktives PlaB-Protein getroffen werden können. Besonders für Studien zur Lokalisation und Sekretion ist aber auch die Detektion des noch inaktiven PlaB-Proteins mit einem gegen das PlaB-Protein gerichteten Antikörper interessant. Deshalb sollte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden.

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem PlaB1 Antikörper führte auch nach Präadsorption gegen die PlaB-Mutante zu einem Antikörper mit zahlreichen und sehr starken Kreuzreaktionsbanden. Nach einer denaturierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot konnte das PlaB-Protein nicht in wildtypischen Legionellen detektiert werden. Eine Bande auf der richtigen Höhe war jedoch für *L. pneumophila* Corby mit PlaB auf dem high-copy Vektor pBCKS möglich. Das *plaB*-Gen liegt auf dem Vektor pBCKS ohne Promotorregion vor und wird daher abhängig vom Promotor des Vektors exprimiert. Somit liegt wahrscheinlich mehr PlaB-Protein als im Wildtyp vor, was die sichtbare PlaB-Bande erklären würde. Ein anderer Grund könnte eine kovalente Verankerung des PlaB-Proteins in der Membran sein. In der denaturierenden SDS-PAGE werden Disulfidbrücken aufgebrochen, wodurch das Protein linearisiert wird. Jedoch könnten kovalente Modifikationen im Protein dazu führen, dass ein Antikörper nicht binden kann. Es handelt sich zwar um einen polyklonalen Antikörper, aber die Immunisierung wurde nur mit einem synthetisch hergestellten 15-mer aus der PlaB-Sequenz durchgeführt. Wenn dieser Bereich des PlaB-Proteins im Wildtyp nicht zugänglich wäre, wäre keine Detektion möglich. Da in dem PlaB überexprimierenden Stamm und der Transkomplementante so viel PlaB-Protein vorhanden ist, dass es bereits im Cytosol akkumuliert (siehe 3.2.3), wäre dieses PlaB nicht modifiziert und könnte von dem Antikörper erkannt werden.

Die Überexpression einer Fusion des Calmodulinbindepoteins mit PlaB in *E. coli* BL21 konnte erfolgreich durchgeführt werden. Im Western Blot ergab die Detektion von CBP-PlaB über den „tag“ für die C-terminale Fusion ein stärkeres Signal, als für die N-terminale Fusion. Der Grund könnte die bessere Expression der C-terminalen Fusion sein. Ebenso wäre es

möglich, dass die N-terminale Fusion instabiler ist und der „tag“ zum Teil abgespalten wird. Interessanterweise hat die N-terminale Fusion eine stärkere enzymatische Aktivität als die C-terminale Fusion. Der Grund liegt wahrscheinlich in dem zur Herstellung des Konstruktes vorgenommenen Aminosäureaustausch zur Eliminierung einer *plaB*-internen *NcoI* Schnittstelle. Diese Veränderung der PlaB-Sequenz war nötig, da *NcoI* zum Klonieren des Fusionsproteins verwendet werden musste. Eventuell wurde die Aktivität des PlaB-Proteins durch die Veränderung der Aminosäuresequenz verringert. Möglicherweise könnte der C-terminale „tag“ auch die für die Aktivität notwendige korrekte Faltung oder Lokalisation des Proteins beeinträchtigen. Ebenso könnte eine vermehrte Abspaltung des N-terminalen „tags“ eine korrekte Faltung ermöglichen und so zu der schwachen Bande im Western Blot und der starken enzymatischen Aktivität führen. Allerdings sollte eine Abspaltung des N-terminalen „tags“ nicht die Detektion durch den PlaB1 Antikörper beeinträchtigen. Mit dem PlaB1 Antikörper wurde jedoch nur das C-terminale Fusionsprotein erkannt, das N-terminale Fusionsprotein konnte nicht detektiert werden.

Für die Immunisierung wurde die C-terminale CBP-PlaB Fusion ausgewählt, da die Aufreinigung über den „tag“ in einer Säule mit Calmodulin durchgeführt wurde und dafür die Bindung des Proteins über den „tag“ essentiell war. Die Aufreinigung führte zu mehreren im Coomassiegel sichtbaren Banden, die auch bei nochmaliger Aufreinigung über die Säule erhalten blieben. Im Western Blot konnte die PlaB-Bande sowohl über den „tag“ als auch über den PlaB1 Antikörper identifiziert werden. Die anderen im Coomassiegel sichtbaren Banden könnten verkürzte PlaB-Peptide sein. Jedoch wäre anzunehmen, dass der PlaB-Antikörper und der CBP-„tag“-Antikörper (bei einer Abspaltung vom N-Terminus) diese Banden auch aufzeigen müssten. Dies war aber nicht der Fall. So muss davon ausgegangen werden, dass das PlaB-Protein nicht vollständig sauber aufgereinigt wurde. Um Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurde nur die als PlaB identifizierte Bande ausgeschnitten und zur Immunisierung verwendet. Leider konnte auch in dieser Immunisierung kein verwendbarer Antikörper PlaB2 gewonnen werden. Die Immunisierung erfolgte mit einem Adjuvanz. Zusätzlich ist die Injektion des Antigens mit den Gelstücken eine Methode, um die Immunreaktion der Tiere zu steigern. Es wäre möglich, dass die Menge des Antigens nicht ausreichend war und die Tiere daher keine Antikörper produzierten.

Da auch das dritte Immunisierungsprotokoll nicht zur Herstellung eines PlaB detektierenden Antikörpers führte, ist davon auszugehen, dass das PlaB-Protein nicht immunogen ist oder das PlaB-Protein in wildtypischen Legionellen in so geringen Mengen vorkommt, dass es nicht im Western Blot detektiert werden kann.

#### 4.2.2 Enzymatisch aktives PlaB ist ein Protein der äußeren Membran

Die „einfache Fraktionierung“ zeigte, dass aktives PlaB-Protein membran-assoziiert vorliegt. Dieses Ergebnis konnte durch die Methode der Sucroседichtegradientenzentrifugation bestätigt werden. Weiterhin ermöglichte dieser Versuch die Lokalisation des enzymatisch aktiven PlaB-Proteins in der äußeren Membran. Obwohl die Methode der Sucroседichtegradientenzentrifugation schon in den 70er Jahren verwendet wurde, gibt es viele verschiedene Protokolle zur Trennung der Membranen über Sucrosegredienten. So gaben Hindahl und Iglewski in ihrer Veröffentlichung an, dass keines der etablierten Protokolle zur erfolgreichen Fraktionierung von *L. pneumophila* Membranen geführt hatte (Hindahl und Iglewski, 1984). Bei Etablierung des in dieser Dissertation angegebenen Protokolls stellte sich heraus, dass zum Aufschluss der Bakterien keinesfalls Ultraschall oder „French pressure cell“ Behandlung unter hohem Druck verwendet werden darf. Eine zu extensive Ultraschallbehandlung kann Membranen zerstören oder einen Zusammenschluss der inneren und äußeren Membran hervorrufen (Osborn und Munson, 1974). Weiterhin bewirkt der Aufschluss der Legionellen in der „French pressure cell“ bei zu hohem Druck ebenfalls einen Zerfall der inneren Membran (Hindahl und Iglewski, 1984). In allen Fällen kann dann keine innere Membranfraktion im Gradienten separiert werden.

Zur Kontrolle der Fraktionierung wurden das DotA-Protein als Marker für die innere Membran und das MOMP-Protein als Marker für die äußere Membran verwendet, da beide Proteine bereits erfolgreich über die Methode der Sucroседichtegradientenzentrifugation lokalisiert worden sind (Roy und Isberg, 1997; Vincent et al., 2006). Der Western Blot zur Detektion des MOMP-Proteins zeigte eine große Menge MOMP-Protein in den Fraktionen der äußeren Membran, aber auch die anderen Fraktionen waren leicht kontaminiert. Dies bedeutet aber nicht, dass die Proben unsauber aufgetrennt wurden, sondern ist ein Charakteristikum des MOMP-Proteins. Eine Kontamination aller Fraktionen ist auch in anderen Arbeiten beschrieben worden (Vincent et al., 2006).

Enzymatisch aktives PlaB-Protein wurde sowohl durch Inkubation der Fraktionen auf Humanblut-Platten, als auch über PLA-Assays lokalisiert. Die hämolytische Aktivität war nur in den Fraktionen der äußeren Membran vorhanden. Die Phospholipase A Aktivität war in den äußeren Membranfraktionen am höchsten, wobei eine geringere PLA Aktivität auch in allen anderen Fraktionen messbar war. Dies ist wiederum auf die bereits diskutierte größere Sensitivität des PLA-Assays gegenüber dem Hämolyseassay zurück zu führen. Die gemessenen enzymatischen Aktivitäten sind klar dem PlaB-Protein zuzuordnen, da der gesamte Versuch parallel auch mit der *L. pneumophila* Corby *plaB::Km K1* Mutante

durchgeführt wurde und hier weder eine hämolytische noch eine PLA-Aktivität nachweisbar war.

Die Analyse der Gradientfraktionen mit einem gegen das PlaB-Protein gerichteten Antikörper würde zusätzlich die Detektion von enzymatisch inaktivem PlaB-Protein ermöglichen. Von einem Nachweis des PlaB-Proteins über einen „tag“ wurde abgesehen, da dieser die Translokation beeinflussen kann und so zu falschen Lokalisationsergebnissen führen könnte. Zusätzlich zu diesen Lokalisationsexperimenten wurde ein Proteinase K-Verdau mit *L. pneumophila* Corby durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich das PlaB-Protein mit einer ansteigenden Konzentration der Proteinase K in zunehmendem Maße von der Oberfläche der Bakterien verdauen lässt. Dieser Versuch bestätigte zum einen die durch den Sucrosegradienten gezeigte Ko-Lokalisation des aktiven PlaB-Proteins mit der äußeren Membran. Zum anderen zeigte die Zugänglichkeit der Proteinase K, dass das PlaB-Protein zumindest teilweise an der Oberfläche der äußeren Membran liegt.

Die durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass enzymatisch aktives PlaB ein Protein der äußeren Membran ist. Jedoch ist noch nicht gezeigt, ob das PlaB-Protein als integrales Protein in der Membran liegt oder der Membran peripher aufgelagert ist. Auch die Aminosäuresequenz des Proteins gibt keinen verlässlichen Hinweis auf die Art der Verankerung. Da keine ausgedehnten hydrophoben Bereiche vorkommen, wird PlaB in Hydrophobizitätsblots nicht als Transmembranprotein vorhergesagt (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/>). Jedoch wurde mit den Algorithmen des ProtCompB Programms die Lokalisation des PlaB-Proteins in der äußeren Membran als am Wahrscheinlichsten berechnet ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)). Weiterhin wurde mit dem COILS 2.2 Programm eine mögliche coiled-coil Region vorhergesagt, die eine Anlagerung eines PlaB-Dimers ermöglichen könnte ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) (siehe Anhang, multipler Sequenzabgleich verschiedener PlaB-Proteine). Eine periphere Verankerung des PlaB-Proteins an der Außenseite der äußeren Membran könnte über eine Interaktion mit den Membranlipiden oder Protein-Protein Wechselwirkungen zustande kommen. In ersten Versuchen mit Chemikalien, die periphere Proteine ablösen, konnte allerdings keine Ablösung des PlaB-Proteins von der Oberfläche erreicht werden. Die Herauslösung war nur mit dem membranzerstörenden Detergenz SDS möglich.

### 4.2.3 Export des PlaB-Proteins

In dieser Arbeit konnte enzymatisch aktives PlaB-Protein in der äußeren Membranfaktion von *Legionella* nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich die Frage, wie das Protein nach der Synthese zur äußeren Membran transportiert wird.

Für das PlaB-Protein konnte weder der Transport über das T1SS, T2SS oder T4BSS, noch eine Tat-abhängige Translokation nachgewiesen werden. Somit könnte PlaB auf einem von diesen Systemen unabhängigen Weg zur äußeren Membran gebracht werden. Möglicherweise sind noch nicht alle in *Legionella* vorkommenden Sekretionssysteme bekannt. Außerdem ist denkbar, dass Substrate bei einem Defekt des Sekretionssystems über einen alternativen Weg transportiert werden können. So kann zum Beispiel ein defektes *dot/icm* T4BSS teilweise durch das *lvh* T4ASS ersetzt werden (Bandyopadhyay et al., 2007; Segal et al., 1999).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *L. pneumophila* einige sekretierte Enzyme mit PLA Aktivitäten über die T2SS und T4BSS über die Membranen transportiert (Banerji et al., 2008). Für das PlaB-Protein ist eine zweistufige Translokation unwahrscheinlich, da sich keine abspaltbare N-terminale Signalsequenz vorhersagen lässt, die sowohl für die Sec- als auch die Tat-abhängige Translokation notwendig wäre (Bendtsen et al., 2005; Emanuelsson et al., 2007). Somit ist die Sekretion über das T2SS und das T5SS eher unwahrscheinlich. Da Substrate des T3SS kontaktinduziert vom Cytosol direkt in die Wirtszelle injiziert werden, das PlaB-Protein aber auf der Oberfläche der Bakterien aktiv ist, ist auch die Nutzung dieses Systems unwahrscheinlich. Virulenzfaktoren können in einer T3SS ähnlichen Sekretion auch über den Flagellenapparat transportiert werden (Young et al., 1999).

Kürzlich wurde ein Algorithmus entwickelt, um *L. pneumophila* Effektorproteine zu identifizieren (Burstein et al., 2009). Dabei wurde unter anderem auch eine putative C-terminale Signalsequenz für *dot/icm* Effektorproteine in die Suche miteinbezogen. Das PlaB-Protein besitzt im C-terminalen Bereich hydrophobe Aminosäuren, die in früheren Arbeiten als möglicher Hinweis auf eine Sekretion über das *dot/icm* System galten (Banerji et al., 2008; Nagai et al., 2005). Jedoch zeigt das PlaB-Protein keine große Übereinstimmung zu der von Burstein et al. veröffentlichten Konsensussequenz, da die C-terminalen 20 Aminosäuren von PlaB keine Häufung der negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Asparaginsäure und schließlich eine Abfolge von Serin und Threonin aufweisen.

Anzumerken ist, dass das PlaB-Protein in einer Veröffentlichung als T2SS Substrat angegeben wurde. Dies geschah ohne Referenz und ist offensichtlich auf eine Verwechslung zurückzuführen (De Buck et al., 2007).

### 4.3 PlaB ist ein Virulenzfaktor

#### 4.3.1 *In vitro*-Studien zur Virulenzassoziation von PlaB

Die replikative Phase des biphasischen Lebenszyklus ist durch Salzresistenz der Legionellen gekennzeichnet. Beim Übergang in die transmissive Phase werden die Bakterien salzsensitiv und bilden eine Flagelle sowie viele weitere Virulenzfaktoren aus. Einige avirulente Legionellen können sehr viel besser auf Nährböden mit hoher NaCl-Konzentration wachsen, als wildtypische Legionellen (Catrenich und Johnson, 1989). Dabei handelt es sich bisher um Mutanten des für die Virulenz wichtigen *dot/icm* T4BSS und um Mutanten, die einen Defekt in Regulatorproteinen des biphasischen Lebenszyklus haben. (Molofsky und Swanson, 2003; Sadosky et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die *L. pneumophila* Corby *plaB* Mutante wie *L. pneumophila* Corby Wildtyp in der replikativen Phase salzresistent und in der transmissiven Phase salzsensitiv ist. Somit scheint das PlaB-Protein keinen Einfluß auf die Funktionalität des virulenzassoziierten *dot/icm* T4BSS zu haben.

In Deutschland wurden im Jahre 2006 96,2% aller Legionellosen durch *L. pneumophila* verursacht (Epidemiologisches\_Bulletin, 50/2007). In einer vorangegangenen Studie wurden 16 *L. pneumophila*-Stämme und 15 non-*pneumophila*-Stämme in Southern Blot Hybridisierungsexperimenten unter niedrigen Stringenz-Bedingungen auf das Vorhandensein des PlaB-Proteins untersucht (Flieger et al., 2004). Dabei hybridisierte die PlaB-Sonde ausschließlich mit den *L. pneumophila*-Stämmen. Dies legte die Vermutung nahe, das PlaB-Protein sei auf *L. pneumophila* beschränkt. Diese Annahme konnte durch die hier durchgeführten Nachweise von *plaB* in non-*pneumophila* Stämmen revidiert werden.

Die Amplifikation des Gens mit Primern für das *L. pneumophila* Corby *plaB* war für alle Stämme außer *L. micdadei* erfolgreich. Auch im Genom von *L. micdadei* lässt sich kein Gen finden, welches homolog zu den bisher bekannten *plaB*-Sequenzen ist (siehe 4.1.1). Übereinstimmend damit zeigte *L. micdadei* auch keine zell-assoziierte Hämolyseaktivität auf Humanblut-Platten. Das Fehlen der zell-assoziierten PLA/LPLA Aktivität von *L. micdadei* wurde bereits früher beschrieben (Flieger et al., 2000).

Auch *L. erythra* und *L. bozemanii* waren nicht hämolytisch. Somit wird das *plaB*-Gen in diesen Stämmen entweder nicht oder verändert exprimiert. Für diese Versuche wurden Flüssigkulturen der OD<sub>600</sub>=1 untersucht. Möglicherweise ist *plaB* in *L. erythra* und *L. bozemanii* erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiv. Ebenso könnte eine vergleichsweise schwächere hämolytische Aktivität zu dem Fehlen des Hämolysehoofs geführt haben. Eine

schwächere Aktivität könnte durch veränderte Promotor-Konsensussequenzen erklärt werden (siehe 4.1.2). Die hämolytische Aktivität von *L. hackeliae*, LLAP10 und *L. lythica* kann nicht mit Sicherheit auf PlaB zurückgeführt werden. Das *plaB*-Gen wurde zwar durch PCR nachgewiesen, muss aber nicht unbedingt exprimiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die hämolytische Aktivität durch ein anderes hämolytisches oder cytotoxisches Enzym hervorgerufen wird. Dazu müsste eine *plaB*-Mutante in diesen Stämmen generiert werden.

**Tabelle 4.1: Verbreitung von PlaB verschiedenen *Legionella* Stämmen. *In silico* Analyse: (+) homologe PlaB-Sequenz im Genom, (-) keine homologe *plaB*-Sequenz im Genom, (\*) keine Sequenzdaten verfügbar; *D. discoideum* Resistenz: (+++) starke Resistenz, (+) Resistenz, (-) Verdau durch *D. discoideum*; Hämolyse: (+) Hämolysehof, (-) kein Hämolysehof; PlaB PCR: PCR-Produkt mit den Primern PlaBF/R.**

Bezeichnung	<i>In silico</i> Analyse	<i>D. discoideum</i> Resistenz <sup>a</sup>	Pathochip Hybridisierung <sup>a</sup>	Hämolyse	PlaB PCR
<i>L. pneumophila</i> Corby #70	+		+	+	+
<i>L. micdadei</i> L01-500 #230	-	+++	-	-	-
<i>L. micdadei</i> W02-539 #231	-	+	-	-	-
<i>L. erythra</i> #132	*	+	+	-	+
<i>L. bozemanii</i> #131	*	+	+	-	+
<i>L. hackeliae</i> Sg1 #133	+	-	+	+	+
<i>L. longbeacheae</i> Sg1 #134	*	+++	-	-	+
<i>L. pneumophila</i> 18398/98 #139	+	+	+	+	+
<i>L. pneumophila</i> Corby #143	+	+++	+	+	+
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I #145	+	+	+	+	+
LLAP10 #148	+	+/-	+	+	+
<i>L. lythica</i> #153	*	-	-	+	+

<sup>a</sup>(Shevchuk, 2008)

In einer anderen Arbeit wurden 12 weitere non-*pneumophila* Stämme auf zell-assoziierte PLA/LPLA Aktivität untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die non-*pneumophila* Stämme *L. gormanii* und *L. spiritensis* starke zell-assoziierte PLA/LPLA Aktivitäten besitzen (Bender et al., 2009).

Zur Identifikation von virulenten *Legionella*-Stämmen wurden ein *Legionella*-Pathochip und ein *Dictyostelium discoideum*-Resistenz-Assay entwickelt (Shevchuk, 2008). Der Chip besteht aus DNA Sonden bekannter und putativer Virulenzfaktoren, darunter auch *plaB*. Hybridisiert die chromosomale DNA des untersuchten Stammes auf dem Chip, so ist das an



dieser Stelle aufgebrachte Gen im untersuchten Stamm vorhanden (Shevchuk, 2008). Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden auch mit dem Pathochip untersucht (Shevchuk, 2008). Bei hoher Stringenz hybridisierten außer *L. micdadei* auch *L. longbeachae* und *L. lythica* nicht mit der *plaB*-Sonde. Für die PCR wurden die gleichen Primer benutzt, auch zum Herstellen der Sonden gedient hatten. Somit scheint der Nachweis der *plaB*-DNA unter den gewählten Bedingungen über PCR sensitiver als die Pathochip-Hybridisierung zu sein.

Der *D. discoideum* Assay basiert auf der Annahme, dass virulente *Legionella* Stämme länger gegen den Verdau durch den Wirt *D. discoideum* resistent sind, als avirulente Stämme. Neben dem als hochvirulent bekanntem Stamm *L. pneumophila* Corby waren unter anderem *L. longbeachae* und *L. micdadei* L01-500 resistent. Da PlaB in *L. micdadei* nicht vorhanden ist, kann das PlaB-Protein in diesem Stamm kein herausragender Virulenzfaktor für die Infektion des Schleimpilzes *D. discoideum* sein. Das Wasserisolat *L. micdadei* W02-539 wurde schneller von *D. discoideum* verdaut, als das Patientenisolat *L. micdadei* L01-500. Dies verdeutlicht, dass die Virulenz schon bei verschiedenen Isolaten unterschiedlich sein kann. Außerdem scheint die Anzahl der Passagen seit der Isolation eine Rolle zu spielen (Flieger et al., 2000).

Kürzlich wurde die PLA/LPLA Aktivität von PlaB in neun verschiedenen *L. pneumophila* Stämmen mit unterschiedlichen Serogruppen untersucht. Wie auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse zeigte sich, dass die *L. pneumophila*-Stämme eine vergleichbare PlaB-Aktivität haben und sich die PlaB-Aktivität von Patientenisolaten im Vergleich zu Umweltisolaten nicht unterschied (Bender et al., 2009).

Bisher ist nicht bekannt, ob es *Legionella*-Stämme gibt, die nur das Pontiac Fieber als milde Verlaufsform der Legionellose, aber keine Lungenentzündung hervorrufen können. Wie gezeigt werden konnte, ist die Expression des PlaB-Proteins nicht als alleiniger Indikator für eine hohe oder niedrige Virulenz der Legionellen geeignet.

#### 4.3.2 Infektion von *A. castellanii*

Infektionen von *A. castellanii* wurden bereits mit der *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante durchgeführt, bei der das *plaB*-Gen durch Einfügen einer Kanamycinkassette in den C-terminalen Bereich ausgeschaltet wurde. Bei der neu klonierten *L. pneumophila* Corby *plaB::Km* K1 knockout Mutante wurde das *plaB*-Gen chromosomal deletiert. Eine *A. castellanii* Infektion mit dieser Mutante wurde durchgeführt, um sicher zu stellen, dass ein

möglicher Replikationsdefekt von *plaB*-Mutanten nicht durch das Vorhandensein von N-terminalen Teilstücken des PlaB-Proteins überdeckt wird. Die *plaB* knock-out Mutante zeigte keinen Replikationsdefekt bei einer Infektion von *A. castellanii*. Auch die Infektion von U937 Makrophagen und *A. castellanii* mit der *plaB1*-Insertionsmutante hatte zuvor schon zu dem gleichen Ergebnis geführt (Flieger et al., 2004). Da auch *plaA*- (Flieger et al., 2002) und *plaC*-Mutanten (Banerji et al., 2005) keinen Defekt aufweisen, scheinen PLA/LPLA von *Legionella* bei der Infektion von *A. castellanii* für die Replikation entbehrlich zu sein. Somit scheint PlaB während der Infektion von *A. castellanii* oder humanen Makrophagen nicht für die Nährstoffzufuhr oder Bildung des Phagolysosoms essentiell zu sein. Es könnte allerdings auch sein, dass andere PLA/LPLA den Ausfall einer Aktivität kompensieren. Obwohl das Fehlen der sekretierten und zell-assoziierten PLA/LPLA in Zellkulturexperimenten keine Auswirkungen auf die Replikation hat, wird das PlaB-Protein intrazellulär in U937-Zellen exprimiert und ist enzymatisch aktiv (Bender et al., 2009). Dies lässt auf eine komplexere Funktion im Zellverband schließen. Deshalb wurden Meerschweinchen-Infektionen durchgeführt.

#### 4.3.3 Virulenz im Meerschweinchenmodell

Frühere Studien haben gezeigt, dass *plaB*-Mutanten in *A. castellanii* und U937 humanen Makrophagen-Zelllinien keine veränderte Replikationsrate aufweisen (Flieger et al., 2004). Trotzdem wird *plaB* in Zellkultur exprimiert und die PLA/LPLA Aktivität kann ab 48 h nach der Infektion gemessen werden (Bender et al., 2009). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine komplexere Funktion des PlaB-Proteins im Zellverband vermutet und eine Infektion im Meerschweinchen-Infektionsmodell durchgeführt. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit der intratracheal infizierten Tiere wurden Lunge und Milz entnommen und die CFU in Relation zum Inokulum bestimmt. Die wildtypischen Legionellen konnten sich 20-mal besser in den Meerschweinchenlungen vermehren als die *plaB*-defizienten Stämme. Außerdem wurden 100-mal mehr wildtypische Legionellen in der Milz gefunden als *plaB*-Mutanten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das PlaB-Protein wichtig für die Besiedelung der Lunge und für die Ausbreitung der Bakterien in die Milz ist. Die Ausbreitung von *L. pneumophila* Corby von der Meerschweinchen-Lunge in andere Organe wie die Leber, Milz und die Nieren infolge einer Bakteriämie wurde bereits beschrieben (Jepras et al., 1985).

Die histopathologische Untersuchung der mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp infizierten Lungen zeigte das in der Literatur beschriebene typische Bild einer Bronchopneumonie (Davis et al., 1983; Jepras et al., 1985; Twisk-Meijssen et al., 1987). So zeigte die Hämatoxilin/Eosin Färbung, dass die ansonsten luftgefüllten und dem Gasaustausch dienenden Alveolen nach der Infektion mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp mit intakten und lysierten Granulozyten, Alveolarmakrophagen und Zelltrümmern gefüllt waren. Bei einer Infektion mit der *plaB1*-Mutante war die beschriebene Entzündungsreaktion auf lokal begrenzte Bereiche in der Nähe der Bronchiolen beschränkt. Der Grund liegt darin, dass die Bakterien von dort aus in das Lungengewebe eintreten. Offensichtlich konnte sich die *L. pneumophila* Corby *plaB1*-Mutante nicht so schnell in der Lunge ausbreiten und replizieren wie die wildtypischen Bakterien. Wie die immunohistochemische Detektion der Alveolarmakrophagen und der Legionellen zeigte, wanderten auch die Alveolarmakrophagen gezielt in die mit Legionellen infizierten Bereiche ein. Somit waren im Falle einer Infektion mit wildtypischen Legionellen sehr viel mehr Makrophagen über viel größere Bereiche der Lungen verteilt zu finden. Die immunohistologische Detektion des Endothels zeigte, dass die wildtypischen Legionellen die Lungenendothelien stark zerstörten und viele Trümmer in den Alveolen Reste der Endothelien waren. Die Lungenendothelien kleiden die Blutgefäßwände und das Lungenparenchym aus. Es ist gut vorstellbar, dass die wildtypischen Legionellen durch die Zerstörung der Endothelien sehr viel leichter vom Lungengewebe aus ins Blut eintreten und in die Milz gelangen können. Dies würde die weitaus geringere Anzahl der *plaB*-Mutante in der Milz erklären. Hätte das PlaB-Protein keine Bedeutung für die Ausbreitung der Bakterien in andere Organe, so hätte das Verhältnis der wildtypischen Bakterien zu der *plaB*-Mutante in der Milz dem Verhältnis in der Lunge entsprechen müssen. Weiterhin muss das *plaB*-Protein auch eine Rolle für die Ausbreitung innerhalb des Lungengewebes spielen, da sonst die Menge der wildtypischen Bakterien und der *plaB*-Mutante in der Lunge gleich wäre.

Für die immunhistologischen Studien wurde auch *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) eingesetzt. Die Transkomplementante konnte den wildtypischen Phänotyp nicht vollständig wiederherstellen. Durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Nährböden konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* Corby *plaB1* (pJB04) seinen Vektor im Laufe der Infektion verloren hatte. Somit scheint PlaB, wie auch schon in den Zellkulturversuchen gezeigt, für die Replikation nicht wichtig zu sein. Der Verlust von Plasmiden aus *Legionella* wurde bereits bei anderen Meerschweincheninfektion beschrieben (Higa und Edelstein, 2001).

Somit zeigen sowohl die CFU-Bestimmung als auch die histopathologischen Untersuchungen, dass PlaB für die effiziente Kolonisierung der Lunge und die Ausbreitung in den Lungen und zur Milz notwendig ist.

Die beobachtete verminderte Virulenz von *plaB*-negativen Bakterien lässt sich durch verschiedene Effekte der PLA/LPLA Aktivität von PlaB erklären. Die enzymatische Aktivität von PlaB könnte cytotoxisch wirken und direkt das Lungengewebe und den Lungensurfactant zerstören. Denkbar wäre auch eine Modulation der Inflammation über die Aktivierung von Signalkaskaden der Wirtszellen, was dann ebenfalls zur Zerstörung des Lungengewebes führt. Es ist bereits bekannt, dass das Abspalten von FFA aus Membranphospholipiden zu einem Zusammenbruch der Membranintegrität sowie zur Entstehung des zytotoxischen und immunmodulatorischen Lysophosphatidylcholins führt (Kume et al., 1992). In gesunden Lungen bedeckt der Lungensurfactant die Alveolaroberfläche, die Broncheolen und die kleinen Luftwege. Auf der Alveolaroberfläche dient der Surfactant dazu, die Oberflächenspannung zu reduzieren. Dadurch wird der Atemvorgang möglich und die Alveolen verkleben nicht beim Ausatmen, was zum Kollabieren der Lunge führen würde.

Die Hauptbestandteile des Surfactant sind Phosphatidylcholin und Phosphatidylglyzerol, die durch PlaB am besten verwerteten Substrate (Flieger et al., 2004). Bakterielle PLA werden oft mit der Zerstörung des Lungensurfactants in Zusammenhang gebracht. Dies wurde für *L. pneumophila* *in vitro* bestätigt (Flieger et al., 2000). Das Versagen der Atmung bei der Legionärskrankheit könnte also durch Zerstörung des Surfactants, der entzündeten Lunge und den dadurch nur noch unzureichend stattfindenden Gasaustausches verursacht werden.

#### 4.3.4 Rolle der *Legionella*-Virulenzfaktoren Flagellin, Msp und Mip

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, sind *plaB*-defiziente Legionellen im Meerschweinchenmodell virulenzattenuiert. Ein ähnlicher Phänotyp ist auch für Mutanten der Msp-Protease und der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase Mip beschrieben (Moffat et al., 1994; Wagner et al., 2007). Aufgereinigte Msp-Protease ruft Läsionen in den Meerschweinchenlungen hervor, die nicht von Läsionen unterscheidbar sind, die durch die Infektion mit *L. pneumophila* entstehen (Baskerville et al., 1986). Das Mip-Protein ist wichtig für den Infektionsprozeß, da *mip*-Mutanten im Vergleich zu wildtypischen Legionellen nur eine vergleichsweise schwache Infektion der Meerschweinchenlungen hervorrufen und eine verminderte Fähigkeit haben sich im Körper der Tiere auszubreiten (Wagner et al., 2007). Um

auszuschließen, dass die im Tierversuch beobachtete Virulenzattenuation von *plaB*-defizienten Legionellen auf die Virulenzfaktoren Mip und Msp zurückzuführen ist, wurde die *plaB*-Mutante auf Msp-Proteaseaktivität und Mip-Expression untersucht. PlaB-defiziente Legionellen besitzen volle Msp-Proteaseaktivität und produzieren genauso viel Mip-Protein wie *L. pneumophila* Corby Wildtyp. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die im Tiermodell beobachtete Virulenzattenuation auf die Msp-Protease oder das Mip-Protein zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurde untersucht, ob Flagellin-, Msp- und Mip-defiziente Mutanten noch *plaB*-spezifische Aktivität aufweisen. Dazu wurden sowohl die *flaA*-, Msp- (*proA*), als auch die *mip*-Mutante auf Humanblut-Platten und im PLA-Aktivitätsassay getestet. Alle Mutanten zeigten *plaB*-spezifische Hämolyse und PLA Aktivität. Somit haben auch unflagellierte Legionellen PlaB auf ihrer Oberfläche. Weiterhin wird PlaB nicht durch die Msp-Protease aktiviert. Damit unterscheidet sich PlaB von PlaC, einer sekretierten PLA/LPLA, Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase (GCAT), und Lipaseaktivität von *Legionella*, welche durch die Msp-Protease in ihre aktive Form überführt wird (Banerji et al., 2005). Weiterhin arbeitet PlaB unabhängig von dem Mip-Protein. Das Mip-Protein ist notwendig für die Aktivität einer sekretierten Phospholipase C in *Legionella* (Debroy et al., 2006).

#### 4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung des PlaB-Proteins liefert grundlegende Erkenntnisse zur Expression, Aktivität, Lokalisation und Virulenzassoziation von PlaB.

Wie gezeigt werden konnte, sind die Genexpression und die enzymatische Aktivität in der stationären Phase sehr viel geringer als in der exponentiellen Phase. Es wäre interessant zu untersuchen, ob PlaB in der cysten-ähnlichen MIF-Form aktiv ist. Es sind weitere Studien nötig, um zu klären, welche Faktoren die Expression des *plaB*-Gens steuern.

Es konnte gezeigt werden, dass enzymatisch aktives PlaB ein Protein der äußeren Membran ist. Western Blot Experimente mit einem PlaB detektierenden Antikörper könnten zeigen, ob enzymatisch inaktives PlaB auch in anderen Kompartimenten der Bakterien vorkommt. In diesem Zusammenhang könnte untersucht werden, ob die Aktivität des PlaB-Proteins von der Lokalisation oder einem weiteren Aktivierungsschritt abhängt. Weiterhin sollte geklärt werden, wie der Export des PlaB-Proteins vom Cytosol zur äußeren Membran geschieht. Ein weiteres Thema ist die Verankerung des PlaB-Proteins in/an der äußeren Membran. Periphere Proteine können durch verschiedene Chemikalien von der Membran abgelöst werden, während integrale Proteine nur durch die Zerstörung der Membran in Lösung gehen. *In silico* Analysen sagen eine coiled-coil Domäne in PlaB voraus. Es wäre möglich, dass PlaB als Dimer in der Membran verankert ist. Da native Gelelektrophoresen zur Auftrennung von Membranproteinen ungeeignet sind, könnten cross-linking Studien und ein anschließender Western Blot mit einem PlaB-spezifischen Antikörper Aufschluß über eine Dimerisierung des PlaB-Proteins geben.

Das PlaB-Protein ist die erste Phospholipase A/Lysophospholipase A in *Legionella*, für die eine Bedeutung bei der Kolonisierung der Lunge und die damit verbundene Entstehung der Legionärskrankheit nachgewiesen werden konnte. Weitere Studien werden nötig sein, um zu zeigen wie diese Phospholipase A/Lysophospholipase A zu der Virulenz von *L. pneumophila* beiträgt. Die Tatsache, dass im einzelligen *in vivo* Modell kein Replikationsdefekt festgestellt werden konnte, macht eine spezielle cytolytische Funktion oder einen immunmodulatorischen Effekt oder bei der Ausbreitung der Bakterien im Körper wahrscheinlich. So könnte die Zerstörung des Lungensurfactants, des Gewebes und der Gefäße den Wirt schwächen und damit die Replikation und Ausbreitung der Bakterien erleichtern. Es ist auch nicht auszuschließen, dass PlaB als Phospholipase A freie Fettsäuren bereitstellt, die dann in die  $\beta$ -Oxidation eingehen und so zur Energiegewinnung genutzt werden. Weiterhin könnte PlaB für

den Aufbau und den Erhalt der replikativen Vakuole und den anschließenden Austritt aus der Vakuole eine Rolle spielen.

*Legionella* ist ein in Protozoen replizierender Umweltkeim. Jedoch nutzt das Bakterium die gleichen Mechanismen, um sich in Lungenmakrophagen als „Fehlwirt“ zu replizieren. PlaB-Aktivität konnte während des intrazellulären Wachstums in U937 Makrophagen Zelllinien, aber auch in *A. castellanii* nachgewiesen werden (Bender et al., 2009). Daher ist es sinnvoll, die eigentliche Rolle von PlaB während des Lebenszyklus im natürlichen Wirt, z.B. *A. castellanii*, aufzuklären. Als Fitnessfaktor könnte PlaB in *A. castellanii* eine Rolle für die Ernährung, die Membranzusammensetzung oder die Regulation des Stoffwechsels spielen. Die Herstellung von rekombinantem, aktivem PlaB wäre wünschenswert. Zum einen könnte gezeigt werden, ob PlaB einen weiteren prokaryotischen oder eukaryotischen Kofaktor für seine enzymatische Aktivität benötigt. Zum anderen würde eine Infektion von Meerschweinchen mit rekombinanten PlaB eine gezielte Aufklärung des Wirkmechanismus erleichtern, da von beobachteten Effekten direkt auf eine Beteiligung des PlaB-Proteins geschlossen werden könnte. Interessant wäre auch die Untersuchung dosisabhängiger Effekte, da Phospholipasen oft in hoher Dosis zytolytisch und in geringerer Konzentration immunmodulatorisch wirken können.

Da es anscheinend kaum möglich ist einen Antikörper herzustellen, der PlaB in wildtypischen Legionellen ausreichend detektieren kann, sollte PlaB mit einem „tag“ versehen werden, der die Lokalisation nicht beeinflusst. Neben dem direkten Nachweis von aktivem PlaB wäre dann auch die Lokalisation von enzymatisch inaktivem PlaB möglich. Zusätzlich könnten auch Immunfluoreszenzstudien durchgeführt werden.

## Literaturverzeichnis

- Abdallah, A. M.; Gey van Pittius, N. C.; Champion, P. A.; Cox, J.; Luirink, J.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Appelmelk, B. J. und Bitter, W. (2007): Type VII secretion--mycobacteria show the way, *Nat Rev Microbiol* 5 [11], Seite 883-91.
- Adeleke, A. A.; Fields, B. S.; Benson, R. F.; Daneshvar, M. I.; Pruckler, J. M.; Ratcliff, R. M.; Harrison, T. G.; Weyant, R. S.; Birtles, R. J.; Raoult, D. und Halablab, M. A. (2001): *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species, *Int J Syst Evol Microbiol* 51 [Pt 3], Seite 1151-60.
- Adeleke, A.; Pruckler, J.; Benson, R.; Rowbotham, T.; Halablab, M. und Fields, B. (1996): *Legionella*-like amoebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease, *Emerg Infect Dis* 2 [3], Seite 225-30.
- Albert-Weissenberger, C.; Cazalet, C. und Buchrieser, C. (2007): *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa, *Cell Mol Life Sci* 64 [4], Seite 432-48.
- Albert, C.; Jacobi, S.; De Buck, E.; Lammertyn, E. und Heuner, K. (2006): Identification of target proteins of the lss secretion system of *Legionella pneumophila* Corby, Cianciotto, N. P., Abu Kwaik, Y., Edelstein, P.H., Fields, B. S., Geary, D.F., Harrison, T.G., Joseph, C.A., Ratcliff, R. M., Stout J.E., Swanson, M.S. , *Legionella*, state of the art 30 years after its recognition Seite 221-223, ASM Press, Washington DC.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25 [17], Seite 3389-402.
- Andrews, D. L.; Beames, B.; Summers, M. D. und Park, W. D. (1988): Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector, *Biochem J* 252 [1], Seite 199-206.
- Aragon, V.; Kurtz, S. und Cianciotto, N. P. (2001): *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection, *Infect Immun* 69 [1], Seite 177-85.
- Aragon, V.; Kurtz, S.; Flieger, A.; Neumeister, B. und Cianciotto, N. P. (2000): Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*, *Infect Immun* 68 [4], Seite 1855-63.
- Aragon, V.; Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2002): *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities, *Microbiology* 148 [Pt 7], Seite 2223-31.
- Arpigny, J. L. und Jaeger, K. E. (1999): Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem J* 343 Pt 1, Seite 177-83.



- Atlas, R. M. (1999): *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control, Environ Microbiol 1 [4], Seite 283-93.
- Aurass, P.; Pless, B.; Rydzewski, K.; Holland, G.; Bannert, N. und Flieger, A. (2009): bdhA-patD operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of *Legionella pneumophila* mutants defective for amoeba infection, Appl Environ Microbiol 75 [13], Seite 4506-15.
- Ayers, D. G.; Auble, D. T. und deHaseth, P. L. (1989): Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Role of the spacer DNA in functional complex formation, J Mol Biol 207 [4], Seite 749-56.
- Bachman, M. A. und Swanson, M. S. (2001): RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase, Mol Microbiol 40 [5], Seite 1201-14.
- Bachman, M. A. und Swanson, M. S. (2004): Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase, Infect Immun 72 [5], Seite 2468-76.
- Bandyopadhyay, P.; Liu, S.; Gabbai, C. B.; Venitelli, Z. und Steinman, H. M. (2007): Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*, Infect Immun 75 [2], Seite 723-35.
- Banerji, S.; Aurass, P. und Flieger, A. (2008): The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence, Int J Med Microbiol 298 [3-4], Seite 169-81.
- Banerji, S.; Bewersdorff, M.; Hermes, B.; Cianciotto, N. P. und Flieger, A. (2005): Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*, Infect Immun 73 [5], Seite 2899-909.
- Banerji, S. und Flieger, A. (2004): Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria?, Microbiology 150 [Pt 3], Seite 522-5.
- Banga, S.; Gao, P.; Shen, X.; Fiscus, V.; Zong, W. X.; Chen, L. und Luo, Z. Q. (2007): *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family, Proc Natl Acad Sci U S A 104 [12], Seite 5121-6.
- Baskerville, A.; Conlan, J. W.; Ashworth, L. A. und Dowsett, A. B. (1986): Pulmonary damage caused by a protease from *Legionella pneumophila*, Br J Exp Pathol 67 [4], Seite 527-36.
- Baskerville, A.; Dowsett, A. B.; Fitzgeorge, R. B.; Hambleton, P. und Broster, M. (1983): Ultrastructure of pulmonary alveoli and macrophages in experimental Legionnaires' disease, J Pathol 140 [2], Seite 77-90.

- Bellinger-Kawahara, C. und Horwitz, M. A. (1990): Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes, J Exp Med 172 [4], Seite 1201-10.
- Bender (2009): Biochemische und funktionelle Charakterisierung der zell-assoziierten Phospholipase A, PlaB, von *Legionella pneumophila*, Robert-Koch-Institut, Wernigerode.
- Bender, J. und Flieger, A. (2009 (in press)): Lipases as pathogenicity factors of bacterial pathogens of humans, Timmis, K. N., Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids and derived compounds, Springer-Verlag GmbH Heidelberg, Germany.
- Bender, J.; Rydzewski, K.; Broich, M.; Schunder, E.; Heuner, K. und Flieger, A. (2009): Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis, J Biol Chem.
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Widdick, D.; Palmer, T. und Brunak, S. (2005): Prediction of twin-arginine signal peptides, BMC Bioinformatics 6, Seite 167.
- Benson, R. F. und Fields, B. S. (1998): Classification of the genus *Legionella*, Semin Respir Infect 13 [2], Seite 90-9.
- Berger, K. H. und Isberg, R. R. (1993): Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*, Mol Microbiol 7 [1], Seite 7-19.
- Berks, B. C.; Palmer, T. und Sargent, F. (2005): Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway, Curr Opin Microbiol 8 [2], Seite 174-81.
- Blackmon, J. A.; Chandler, F. W.; Cherry, W. B.; England, A. C., 3rd; Feeley, J. C.; Hicklin, M. D.; McKinney, R. M. und Wilkinson, H. W. (1981): Legionellosis, Am J Pathol 103 [3], Seite 429-65.
- Brenner, D. J.; Steigerwalt, A. G. und McDade, J. E. (1979): Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova, Ann Intern Med 90 [4], Seite 656-8.
- Broich, M.; Rydzewski, K.; McNealy, T. L.; Marre, R. und Flieger, A. (2006): The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32, J Bacteriol 188 [4], Seite 1218-26.
- Brok, R. G.; Boots, A. P.; Dekker, N.; Verheij, H. M. und Tommassen, J. (1998): Sequence comparison of outer membrane phospholipases A: implications for structure and for the catalytic mechanism, Res Microbiol 149 [10], Seite 703-10.

- Brüggemann, H.; Hagman, A.; Jules, M.; Sismeiro, O.; Dillies, M. A.; Gouyette, C.; Kunst, F.; Steinert, M.; Heuner, K.; Coppee, J. Y. und Buchrieser, C. (2006): Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*, *Cell Microbiol* 8 [8], Seite 1228-40.
- Bryant, A. E. und Stevens, D. L. (1996): Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells, *Infect Immun* 64 [1], Seite 358-62.
- Bunting, M.; Lorant, D. E.; Bryant, A. E.; Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Stevens, D. L. und Prescott, S. M. (1997): Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells, *J Clin Invest* 100 [3], Seite 565-74.
- Burrows, P. C.; Severinov, K.; Ishihama, A.; Buck, M. und Wigneshweraraj, S. R. (2003): Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element, *J Biol Chem* 278 [32], Seite 29728-43.
- Burstein, D.; Zusman, T.; Degtyar, E.; Viner, R.; Segal, G. und Pupko, T. (2009): Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach, *PLoS Pathog* 5 [7], Seite e1000508.
- Byrne, B. und Swanson, M. S. (1998): Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions, *Infect Immun* 66 [7], Seite 3029-34.
- Campodonico, E. M.; Chesnel, L. und Roy, C. R. (2005): A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system, *Mol Microbiol* 56 [4], Seite 918-33.
- Catrenich, C. E. und Johnson, W. (1989): Characterization of the selective inhibition of growth of virulent *Legionella pneumophila* by supplemented Mueller-Hinton medium, *Infect Immun* 57 [6], Seite 1862-4.
- Cazalet, C.; Rusniok, C.; Brüggemann, H.; Zidane, N.; Magnier, A.; Ma, L.; Tichit, M.; Jarraud, S.; Bouchier, C.; Vandenesch, F.; Kunst, F.; Etienne, J.; Glaser, P. und Buchrieser, C. (2004): Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity, *Nat Genet* 36 [11], Seite 1165-73.
- Chayakulkeeree, M.; Sorrell, T. C.; Siafakas, A. R.; Wilson, C. F.; Pantarat, N.; Gerik, K. J.; Boadle, R. und Djordjevic, J. T. (2008): Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*, *Mol Microbiol* 69 [4], Seite 809-26.
- Chen, J.; Reyes, M.; Clarke, M. und Shuman, H. A. (2007): Host cell-dependent secretion and translocation of the LepA and LepB effectors of *Legionella pneumophila*, *Cell Microbiol* 9 [7], Seite 1660-71.

- Chien, M.; Morozova, I.; Shi, S.; Sheng, H.; Chen, J.; Gomez, S. M.; Asamani, G.; Hill, K.; Nuara, J.; Feder, M.; Rineer, J.; Greenberg, J. J.; Steshenko, V.; Park, S. H.; Zhao, B.; Teplitskaya, E.; Edwards, J. R.; Pampou, S.; Georghiou, A.; Chou, I. C.; Iannuccilli, W.; Ulz, M. E.; Kim, D. H.; Geringer-Sameth, A.; Goldsberry, C.; Morozov, P.; Fischer, S. G.; Segal, G.; Qu, X.; Rzhetsky, A.; Zhang, P.; Cayanis, E.; De Jong, P. J.; Ju, J.; Kalachikov, S.; Shuman, H. A. und Russo, J. J. (2004): The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*, *Science* 305 [5692], Seite 1966-8.
- Christie, P. J.; Atmakuri, K.; Krishnamoorthy, V.; Jakubowski, S. und Cascales, E. (2005): Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, *Annu Rev Microbiol* 59, Seite 451-85.
- Christie, P. J. und Vogel, J. P. (2000): Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells, *Trends Microbiol* 8 [8], Seite 354-60.
- Cianciotto, N. P. (2001): Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, *Int J Med Microbiol* 291 [5], Seite 331-43.
- Cianciotto, N. P. (2005): Type II secretion: a protein secretion system for all seasons, *Trends Microbiol* 13 [12], Seite 581-8.
- Coburn, B.; Sekirov, I. und Finlay, B. B. (2007): Type III secretion systems and disease, *Clin Microbiol Rev* 20 [4], Seite 535-49.
- Conover, G. M.; Derre, I.; Vogel, J. P. und Isberg, R. R. (2003): The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity, *Mol Microbiol* 48 [2], Seite 305-21.
- Cox, G. M.; McDade, H. C.; Chen, S. C.; Tucker, S. C.; Gottfredsson, M.; Wright, L. C.; Sorrell, T. C.; Leidich, S. D.; Casadevall, A.; Ghannoum, M. A. und Perfect, J. R. (2001): Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*, *Mol Microbiol* 39 [1], Seite 166-75.
- Davis, G. S.; Winn, W. C., Jr.; Gump, D. W. und Beaty, H. N. (1983): The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs, *J Infect Dis* 148 [5], Seite 823-35.
- Davis, G. S.; Winn, W. C., Jr.; Gump, D. W.; Craighead, J. M. und Beaty, H. N. (1983): Legionnaires' pneumonia in guinea pigs and rats produced by aerosol exposure, *Chest* 83 [5 Suppl], Seite 15S-16S.
- De Buck, E.; Anne, J. und Lammertyn, E. (2007): The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, *Microbiology* 153 [Pt 12], Seite 3948-53.
- Debroy, S.; Aragon, V.; Kurtz, S. und Cianciotto, N. P. (2006): *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of

- phospholipase C-like activity in culture supernatants, *Infect Immun* 74 [9], Seite 5152-60.
- DebRoy, S.; Dao, J.; Soderberg, M.; Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2006): *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [50], Seite 19146-51.
- deHaseth, P. L.; Zupancic, M. L. und Record, M. T., Jr. (1998): RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase, *J Bacteriol* 180 [12], Seite 3019-25.
- Dekker, N. (2000): Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function, *Mol Microbiol* 35 [4], Seite 711-7.
- Delepelaire, P. (2004): Type I secretion in Gram-negative bacteria, *Biochim Biophys Acta* 1694 [1-3], Seite 149-61.
- Desvaux, M.; Parham, N. J. und Henderson, I. R. (2004): The autotransporter secretion system, *Res Microbiol* 155 [2], Seite 53-60.
- Diederer, B. M. (2008): *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J Infect* 56 [1], Seite 1-12.
- Dietrich, C.; Heuner, K.; Brand, B. C.; Hacker, J. und Steinert, M. (2001): Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells, *Infect Immun* 69 [4], Seite 2116-22.
- Dilks, K.; Rose, R. W.; Hartmann, E. und Pohlschroder, M. (2003): Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey, *J Bacteriol* 185 [4], Seite 1478-83.
- Dombroski, A. J.; Walter, W. A.; Record, M. T., Jr.; Siegele, D. A. und Gross, C. A. (1992): Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma-70 exhibit specificity of binding to promoter DNA, *Cell* 70 [3], Seite 501-12.
- Drozanski, W. (1956): Fatal bacterial infection in soil amoebae, *Acta Microbiol Pol* 5 [3-4], Seite 315-7.
- Edelstein, P. H.; Edelstein, M. A.; Higa, F. und Falkow, S. (1999): Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [14], Seite 8190-5.
- Edelstein, P. H.; Hu, B.; Higa, F. und Edelstein, M. A. (2003): *lvgA*, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor, *Infect Immun* 71 [5], Seite 2394-403.

- Edelstein, P. H.; Hu, B.; Shinzato, T.; Edelstein, M. A.; Xu, W. und Bessman, M. J. (2005): *Legionella pneumophila* NudA Is a Nudix hydrolase and virulence factor, Infect Immun 73 [10], Seite 6567-76.
- Edelstein, Paul H. (2008): Legionnaires' disease: history and clinical findings, Heuner, K. and Swanson, M., Legionella molecular microbiology, Caister academic press.
- Edwards, M. T.; Fry, N. K. und Harrison, T. G. (2008): Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling, Microbiology 154 [Pt 3], Seite 852-64.
- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; von Heijne, G. und Nielsen, H. (2007): Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools, Nat Protoc 2 [4], Seite 953-71.
- Ensminger, A. W. und Isberg, R. R. (2009): *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts, Curr Opin Microbiol 12 [1], Seite 67-73.
- Epidemiologisches\_Bulletin (50/2007): Legionellose im Jahr 2006, Epidemiologisches Bulletin Robert-Koch Institut Berlin.
- Ewig, S.; Tuschy, P. und Fatkenheuer, G. (2002): Diagnosis and treatment of *Legionella* pneumonia, Pneumologie 56 [11], Seite 695-703.
- Fang, X.; Gibson, S.; Flowers, M.; Furui, T.; Bast, R. C., Jr. und Mills, G. B. (1997): Lysophosphatidylcholine stimulates activator protein 1 and the c-Jun N-terminal kinase activity, J Biol Chem 272 [21], Seite 13683-9.
- Farn, J. L.; Strugnell, R. A.; Hoyne, P. A.; Michalski, W. P. und Tennent, J. M. (2001): Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*, J Bacteriol 183 [22], Seite 6717-20.
- Faulkner, G.; Berk, S. G.; Garduno, E.; Ortiz-Jimenez, M. A. und Garduno, R. A. (2008): Passage through *Tetrahymena tropicalis* triggers a rapid morphological differentiation in *Legionella pneumophila*, J Bacteriol 190 [23], Seite 7728-38.
- Fettes, P. S.; Forsbach-Birk, V.; Lynch, D. und Marre, R. (2001): Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator csrA affects cell size, flagellation, and pigmentation, Int J Med Microbiol 291 [5], Seite 353-60.
- Fettes, P. S.; Susa, M.; Hacker, J. und Marre, R. (2000): Characterization of the *Legionella pneumophila* gene ligA, Int J Med Microbiol 290 [3], Seite 239-50.
- Fields, B. S. (1996): The molecular ecology of *legionellae*, Trends Microbiol 4 [7], Seite 286-90.
- Fields, B. S.; Benson, R. F. und Besser, R. E. (2002): *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, Clin Microbiol Rev 15 [3], Seite 506-26.

- Filloux, A.; Hachani, A. und Bleves, S. (2008): The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes, *Microbiology* 154 [Pt 6], Seite 1570-83.
- Flieger, A.; Gong, S.; Faigle, M.; Deeg, M.; Bartmann, P. und Neumeister, B. (2000): Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species, *J Bacteriol* 182 [5], Seite 1321-7.
- Flieger, A.; Gong, S.; Faigle, M.; Mayer, H. A.; Kehrer, U.; Mussotter, J.; Bartmann, P. und Neumeister, B. (2000): Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids, *FEMS Microbiol Lett* 188 [2], Seite 129-33.
- Flieger, A.; Gong, S.; Faigle, M.; Northoff, H. und Neumeister, B. (2001): *In vitro* secretion kinetics of proteins from *Legionella pneumophila* in comparison to proteins from non-pneumophila species, *Microbiology* 147 [Pt 11], Seite 3127-34.
- Flieger, A.; Gong, S.; Faigle, M.; Stevanovic, S.; Cianciotto, N. P. und Neumeister, B. (2001): Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*, *J Bacteriol* 183 [6], Seite 2121-4.
- Flieger, A.; Neumeister, B. und Cianciotto, N. P. (2002): Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine, *Infect Immun* 70 [11], Seite 6094-106.
- Flieger, A.; Rydzewski, K.; Banerji, S.; Broich, M. und Heuner, K. (2004): Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity, *Infect Immun* 72 [5], Seite 2648-58.
- Fliermans, C. B.; Cherry, W. B.; Orrison, L. H.; Smith, S. J.; Tison, D. L. und Pope, D. H. (1981): Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, *Appl Environ Microbiol* 41 [1], Seite 9-16.
- Frank, D. W. (1997): The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol Microbiol* 26 [4], Seite 621-9.
- Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Orenstein, W.; Parkin, W. E.; Beecham, H. J.; Sharrar, R. G.; Harris, J.; Mallison, G. F.; Martin, S. M.; McDade, J. E.; Shepard, C. C. und Brachman, P. S. (1977): Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia, *N Engl J Med* 297 [22], Seite 1189-97.
- Fry, N. K.; Alexiou-Daniel, S.; Bangsberg, J. M.; Bernander, S.; Castellani Pastoris, M.; Etienne, J.; Forsblom, B.; Gaia, V.; Helbig, J. H.; Lindsay, D.; Christian Luck, P.; Pelaz, C.; Uldum, S. A. und Harrison, T. G. (1999): A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study, *Clin Microbiol Infect* 5 [8], Seite 462-477.

- Fry, N. K.; Bangsberg, J. M.; Bergmans, A.; Bernander, S.; Etienne, J.; Franzin, L.; Gaia, V.; Hasenberger, P.; Baladron Jimenez, B.; Jonas, D.; Lindsay, D.; Mentula, S.; Papoutsis, A.; Struelens, M.; Uldum, S. A.; Visca, P.; Wannet, W. und Harrison, T. G. (2002): Designation of the European Working Group on *Legionella* Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing Using a standard protocol, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21 [10], Seite 722-8.
- Fujii, Y. und Sakurai, J. (1989): Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C): evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism, Br J Pharmacol 97 [1], Seite 119-24.
- Gabay, J. E. und Horwitz, M. A. (1985): Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*), J Exp Med 161 [2], Seite 409-22.
- Gaia, V.; Fry, N. K.; Afshar, B.; Luck, P. C.; Meugnier, H.; Etienne, J.; Peduzzi, R. und Harrison, T. G. (2005): Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*, J Clin Microbiol 43 [5], Seite 2047-52.
- Garduno, R. A.; Garduno, E.; Hiltz, M. und Hoffman, P. S. (2002): Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms, Infect Immun 70 [11], Seite 6273-83.
- Garduno, R. A.; Garduno, E. und Hoffman, P. S. (1998): Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model, Infect Immun 66 [10], Seite 4602-10.
- George, J. R.; Pine, L.; Reeves, M. W. und Harrell, W. K. (1980): Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*, J Clin Microbiol 11 [3], Seite 286-91.
- Gerlach, R. G. und Hensel, M. (2007): Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens, Int J Med Microbiol 297 [6], Seite 401-15.
- Ghannoum, M. A. (2000): Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis, Clin Microbiol Rev 13 [1], Seite 122-43, table of contents.
- Gibson, F. C., 3rd; Tzianabos, A. O. und Rodgers, F. G. (1994): Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism, Can J Microbiol 40 [10], Seite 865-72.
- Glöckner, G.; Albert-Weissenberger, C.; Weinmann, E.; Jacobi, S.; Schunder, E.; Steinert, M.; Hacker, J. und Heuner, K. (2008): Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands, Int J Med Microbiol 298 [5-6], Seite 411-28.



- Graler, M. H. und Goetzl, E. J. (2002): Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity, *Biochim Biophys Acta* 1582 [1-3], Seite 168-74.
- Hales, L. M. und Shuman, H. A. (1999): *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease, *Infect Immun* 67 [7], Seite 3662-6.
- Hambleton, P.; Bailey, N. E.; Fitzgeorge, R. B. und Baskerville, A. (1985): Clinical chemical responses to experimental airborne legionellosis in the guinea-pig, *Br J Exp Pathol* 66 [2], Seite 173-83.
- Hammer, B. K.; Tateda, E. S. und Swanson, M. S. (2002): A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*, *Mol Microbiol* 44 [1], Seite 107-18.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166 [4], Seite 557-80.
- Helbig, J. H.; Benson, R. F.; Pelaz, C.; Jacobs, E. und Luck, P. C. (2007): Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources, *J Appl Microbiol* 102 [1], Seite 100-5.
- Helbig, J. H.; König, B.; Knospe, H.; Bubert, B.; Yu, C.; Lück, C. P.; Riboldi-Tunnicliffe, A.; Hilgenfeld, R.; Jacobs, E.; Hacker, J. und Fischer, G. (2003): The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells, *Biol Chem* 384 [1], Seite 125-37.
- Helbig, J. H.; Lück, P. C.; Steinert, M.; Jacobs, E. und Witt, M. (2001): Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*, *Lett Appl Microbiol* 32 [2], Seite 83-8.
- Helbig, J. H.; Ludwig, B.; Lück, P. C.; Groh, A.; Witzleb, W. und Hacker, J. (1995): Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes, *Clin Diagn Lab Immunol* 2 [2], Seite 160-5.
- Helmann, J. D. und Chamberlin, M. J. (1988): Structure and function of bacterial sigma factors, *Annu Rev Biochem* 57, Seite 839-72.
- Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Desvaux, M.; Fernandez, R. C. und Ala'Aldeen, D. (2004): Type V protein secretion pathway: the autotransporter story, *Microbiol Mol Biol Rev* 68 [4], Seite 692-744.
- Heuner, K.; Brand, B. C. und Hacker, J. (1999): The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors, *FEMS Microbiol Lett* 175 [1], Seite 69-77.

- Higa, F. und Edelstein, P. H. (2001): Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* *ptsP* ortholog, *Infect Immun* 69 [8], Seite 4782-9.
- High, A. S.; Torosian, S. D. und Rodgers, F. G. (1993): Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a gene (*ompM*) encoding a 25 kDa major outer-membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila*, *J Gen Microbiol* 139 [8], Seite 1715-21.
- Hiltz, M. F.; Sisson, G. R.; Brassinga, A. K.; Garduno, E.; Garduno, R. A. und Hoffman, P. S. (2004): Expression of *magA* in *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 is developmentally regulated and a marker of formation of mature intracellular forms, *J Bacteriol* 186 [10], Seite 3038-45.
- Hindahl, M. S. und Iglewski, B. H. (1984): Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane, *J Bacteriol* 159 [1], Seite 107-13.
- Hindahl, M. S. und Iglewski, B. H. (1986): Outer membrane proteins from *Legionella pneumophila* serogroups and other *Legionella* species, *Infect Immun* 51 [1], Seite 94-101.
- Holm, B. A.; Keicher, L.; Liu, M. Y.; Sokolowski, J. und Enhorning, G. (1991): Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases, *J Appl Physiol* 71 [1], Seite 317-21.
- Horwitz, M. A. (1983): Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes, *J Exp Med* 158 [4], Seite 1319-31.
- Horwitz, M. A. (1983): The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes, *J Exp Med* 158 [6], Seite 2108-26.
- Hovel-Miner, G.; Pampou, S.; Faucher, S. P.; Clarke, M.; Morozova, I.; Morozov, P.; Russo, J. J.; Shuman, H. A. und Kalachikov, S. (2009):  $\sigma^S$  controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*, *J Bacteriol*.
- Igel, Liane (2007): Funktionale und molekulare Charakterisierung des Pad-Proteins von *Legionella pneumophila*, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Technische Universität, Dresden.
- Infektionsepidemiologisches\_Jahrbuch\_meldepflichtiger\_Krankheiten\_für\_2007 (Robert Koch-Institut Berlin, 2008).
- Isberg, R. R.; O'Connor, T. J. und Heidtman, M. (2009): The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells, *Nat Rev Microbiol* 7 [1], Seite 13-24.
- Istivan, T. S. und Coloe, P. J. (2006): Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis, *Microbiology* 152 [Pt 5], Seite 1263-74.

- Jacobi, S. und Heuner, K. (2003): Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*, Int J Med Microbiol 293 [5], Seite 349-58.
- Jepras, R. I.; Fitzgeorge, R. B. und Baskerville, A. (1985): A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs, J Hyg (Lond) 95 [1], Seite 29-38.
- Johnson, T. L.; Abendroth, J.; Hol, W. G. und Sandkvist, M. (2006): Type II secretion: from structure to function, FEMS Microbiol Lett 255 [2], Seite 175-86.
- Juhas, M.; Crook, D. W. und Hood, D. W. (2008): Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence, Cell Microbiol 10 [12], Seite 2377-86.
- Jules, M. und Buchrieser, C. (2007): *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics, FEBS Lett 581 [15], Seite 2829-38.
- Kagan, J. C. und Roy, C. R. (2002): *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites, Nat Cell Biol 4 [12], Seite 945-54.
- Katz, S. M.; Habib, W. A.; Hammel, J. M. und Nash, P. (1982): Lack of airborne spread of infection by *Legionella pneumophila* among guinea pigs, Infect Immun 38 [2], Seite 620-2.
- Katz, S. M. und Hammel, J. M. (1987): The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*, Ann Clin Lab Sci 17 [3], Seite 150-6.
- King, R. J. (1982): Pulmonary surfactant, J Appl Physiol 53 [1], Seite 1-8.
- Köhler, R.; Fanghanel, J.; König, B.; Luneberg, E.; Frosch, M.; Rahfeld, J. U.; Hilgenfeld, R.; Fischer, G.; Hacker, J. und Steinert, M. (2003): Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*, Infect Immun 71 [8], Seite 4389-97.
- Kume, N.; Cybulsky, M. I. und Gimbrone, M. A., Jr. (1992): Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells, J Clin Invest 90 [3], Seite 1138-44.
- La Scola, B.; Birtles, R. J.; Greub, G.; Harrison, T. J.; Ratcliff, R. M. und Raoult, D. (2004): *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, Int J Syst Evol Microbiol 54 [Pt 3], Seite 699-703.
- Lacour, S. und Landini, P. (2004): SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences, J Bacteriol 186 [21], Seite 7186-95.

- Laguna, R. K.; Creasey, E. A.; Li, Z.; Valtz, N. und Isberg, R. R. (2006): A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death, Proc Natl Acad Sci U S A 103 [49], Seite 18745-50.
- Lee, V. T. und Schneewind, O. (2001): Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections, Genes Dev 15 [14], Seite 1725-52.
- Lengeler, J. W., G. Drews and H. G. Schlegel (1999): Biology of the Prokaryotes, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Liebich, Hans-Georg (1999): Funktionelle Histologie der Haustiere, 3. Auflage. Auflage, Schattauer.
- Lightfield, K. L.; Persson, J.; Brubaker, S. W.; Witte, C. E.; von Moltke, J.; Dunipace, E. A.; Henry, T.; Sun, Y. H.; Cado, D.; Dietrich, W. F.; Monack, D. M.; Tsolis, R. M. und Vance, R. E. (2008): Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin, Nat Immunol 9 [10], Seite 1171-8.
- Liles, M. R.; Edelstein, P. H. und Cianciotto, N. P. (1999): The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, Mol Microbiol 31 [3], Seite 959-70.
- Liu, Y. und Luo, Z. Q. (2007): The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome, Infect Immun 75 [2], Seite 592-603.
- Lucas, C. E.; Brown, E. und Fields, B. S. (2006): Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention, Microbiology 152 [Pt 12], Seite 3569-73.
- Lück, P. C. und Steinert, M. (2006): [Pathogenesis, diagnosis and therapy of *Legionella* infections], Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 49 [5], Seite 439-49.
- Lück, P.C. (2008): Diagnostics and clinical disease treatment, Heuner, K. and Swanson, M., *Legionella: Molecular Microbiology* Seite 19-34, Caier Academic press, Norfolk.
- Lupas, A. (1996): Prediction and analysis of coiled-coil structures, Methods Enzymol 266, Seite 513-25.
- Lupas, A.; Van Dyke, M. und Stock, J. (1991): Predicting coiled coils from protein sequences, Science 252 [5010], Seite 1162-4.
- Machner, M. P. und Isberg, R. R. (2006): Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*, Dev Cell 11 [1], Seite 47-56.

- Machner, M. P. und Isberg, R. R. (2007): A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation, *Science* 318 [5852], Seite 974-7.
- Mandell, L. A.; Bartlett, J. G.; Dowell, S. F.; File, T. M., Jr.; Musher, D. M. und Whitney, C. (2003): Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults, *Clin Infect Dis* 37 [11], Seite 1405-33.
- Marra, A.; Blander, S. J.; Horwitz, M. A. und Shuman, H. A. (1992): Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [20], Seite 9607-11.
- Marra, A. und Shuman, H. A. (1989): Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings, *J Bacteriol* 171 [4], Seite 2238-40.
- Masamune, A.; Sakai, Y.; Yoshida, M.; Satoh, A.; Satoh, K. und Shimosegawa, T. (2001): Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF-kappaB and AP-1 in AR42J cells, *Dig Dis Sci* 46 [9], Seite 1871-81.
- McDade, J. E.; Shepard, C. C.; Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Redus, M. A. und Dowdle, W. R. (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, *N Engl J Med* 297 [22], Seite 1197-203.
- Merrick, M. J. (1993): In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N), *Mol Microbiol* 10 [5], Seite 903-9.
- Moffat, J. F.; Edelstein, P. H.; Regula, D. P., Jr.; Cirillo, J. D. und Tompkins, L. S. (1994): Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model, *Mol Microbiol* 12 [5], Seite 693-705.
- Molmeret, M.; Bitar, D. M.; Han, L. und Abu Kwaik, Y. (2004): Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*, *Microbes Infect* 6 [1], Seite 129-39.
- Molmeret, M.; Santic, M.; Asare, R.; Carabeo, R. A. und Abu Kwaik, Y. (2007): Rapid escape of the dot/icm mutants of *Legionella pneumophila* into the cytosol of mammalian and protozoan cells, *Infect Immun* 75 [7], Seite 3290-304.
- Molofsky, A. B.; Shetron-Rama, L. M. und Swanson, M. S. (2005): Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death, *Infect Immun* 73 [9], Seite 5720-34.
- Molofsky, A. B. und Swanson, M. S. (2003): *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication, *Mol Microbiol* 50 [2], Seite 445-61.
- Molofsky, A. B. und Swanson, M. S. (2004): Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle, *Mol Microbiol* 53 [1], Seite 29-40.

- Mougous, J. D.; Cuff, M. E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C. A.; Goodman, A. L.; Joachimiak, G.; Ordonez, C. L.; Lory, S.; Walz, T.; Joachimiak, A. und Mekalanos, J. J. (2006): A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus, *Science* 312 [5779], Seite 1526-30.
- Moyle, H.; Waldburger, C. und Susskind, M. M. (1991): Hierarchies of base pair preferences in the P22 ant promoter, *J Bacteriol* 173 [6], Seite 1944-50.
- Murakami, K. S. und Darst, S. A. (2003): Bacterial RNA polymerases: the whole story, *Curr Opin Struct Biol* 13 [1], Seite 31-9.
- Nagai, H.; Cambronne, E. D.; Kagan, J. C.; Amor, J. C.; Kahn, R. A. und Roy, C. R. (2005): A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [3], Seite 826-31.
- Nagai, H.; Kagan, J. C.; Zhu, X.; Kahn, R. A. und Roy, C. R. (2002): A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes, *Science* 295 [5555], Seite 679-82.
- Nagai, H. und Roy, C. R. (2003): Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems, *Cell Microbiol* 5 [6], Seite 373-83.
- Newsome, A. L.; Scott, T. M.; Benson, R. F. und Fields, B. S. (1998): Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species, *Appl Environ Microbiol* 64 [5], Seite 1688-93.
- Ninio, S. und Roy, C. R. (2007): Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers, *Trends Microbiol* 15 [8], Seite 372-80.
- O'Malley, C. A. (2009): Infection control in cystic fibrosis: cohorting, cross-contamination, and the respiratory therapist, *Respir Care* 54 [5], Seite 641-57.
- Osborn, M. J.; Gander, J. E.; Parisi, E. und Carson, J. (1972): Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane, *J Biol Chem* 247 [12], Seite 3962-72.
- Osborn, M. J. und Munson, R. (1974): Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of Gram-negative bacteria, *Methods Enzymol* 31 [Pt A], Seite 642-53.
- Parry, D. A. (1982): Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins, *Biosci Rep* 2 [12], Seite 1017-24.
- Payne, N. R. und Horwitz, M. A. (1987): Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors, *J Exp Med* 166 [5], Seite 1377-89.

- Pison, U.; Herold, R. und Schürch, S. (1996): The pulmonary surfactant system: biological functions, components, physiochemical properties and alterations during lung disease, *Colloids and surfaces* 114, Seite 165-184.
- Plotkowski, M. C. und Meirelles, M. N. (1997): Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membranes account for *Pseudomonas aeruginosa* survival in human endothelial cells, *J Submicrosc Cytol Pathol* 29 [2], Seite 229-37.
- Pukatzki, S.; Ma, A. T.; Sturtevant, D.; Krastins, B.; Sarracino, D.; Nelson, W. C.; Heidelberg, J. F. und Mekalanos, J. J. (2006): Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [5], Seite 1528-33.
- Rasis, M. und Segal, G. (2009): The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors, *Mol Microbiol* 72 [4], Seite 995-1010.
- Ratcliff, R. M.; Donnellan, S. C.; Lanser, J. A.; Manning, P. A. und Heuzenroeder, M. W. (1997): Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*: implications for function and evolutionary relatedness, *Mol Microbiol* 25 [6], Seite 1149-58.
- Ratcliff, R. M.; Lanser, J. A.; Manning, P. A. und Heuzenroeder, M. W. (1998): Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene, *J Clin Microbiol* 36 [6], Seite 1560-7.
- Ridenour, D. A.; Cirillo, S. L.; Feng, S.; Samrakandi, M. M. und Cirillo, J. D. (2003): Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion, *Infect Immun* 71 [11], Seite 6256-63.
- Ring, B. Z.; Yarnell, W. S. und Roberts, J. W. (1996): Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing, *Cell* 86 [3], Seite 485-93.
- Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2001): Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*, *Infect Immun* 69 [4], Seite 2092-8.
- Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2005): The *Legionella pneumophila* *tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection, *Infect Immun* 73 [4], Seite 2020-32.
- Rossier, O.; Dao, J. und Cianciotto, N. P. (2009): A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*, *Microbiology* 155 [Pt 3], Seite 882-90.

- Rossier, O.; Starkenburg, S. R. und Cianciotto, N. P. (2004): *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia, *Infect Immun* 72 [1], Seite 310-21.
- Rowbotham, T. J. (1980): Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J Clin Pathol* 33 [12], Seite 1179-83.
- Rowbotham, T. J. (1986): Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man, *Isr J Med Sci* 22 [9], Seite 678-89.
- Roy, C. R.; Berger, K. H. und Isberg, R. R. (1998): *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake, *Mol Microbiol* 28 [3], Seite 663-74.
- Roy, C. R. und Isberg, R. R. (1997): Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages, *Infect Immun* 65 [2], Seite 571-8.
- Rydel, T. J.; Williams, J. M.; Krieger, E.; Moshiri, F.; Stallings, W. C.; Brown, S. M.; Pershing, J. C.; Purcell, J. P. und Alibhai, M. F. (2003): The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad, *Biochemistry* 42 [22], Seite 6696-708.
- Sadosky, A. B.; Wiater, L. A. und Shuman, H. A. (1993): Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages, *Infect Immun* 61 [12], Seite 5361-73.
- Saliba, A. M.; Nascimento, D. O.; Silva, M. C.; Assis, M. C.; Gayer, C. R.; Raymond, B.; Coelho, M. G.; Marques, E. A.; Touqui, L.; Albano, R. M.; Lopes, U. G.; Paiva, D. D.; Bozza, P. T. und Plotkowski, M. C. (2005): Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, *Cell Microbiol* 7 [12], Seite 1811-22.
- Sato, H.; Frank, D. W.; Hillard, C. J.; Feix, J. B.; Pankhaniya, R. R.; Moriyama, K.; Finck-Barbancon, V.; Buchaklian, A.; Lei, M.; Long, R. M.; Wiener-Kronish, J. und Sawa, T. (2003): The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU, *Embo J* 22 [12], Seite 2959-69.
- Saunders, N. A.; Doshi, N. und Harrison, T. G. (1992): A second serogroup of *Legionella erythra* serologically indistinguishable from *Legionella rubrilucens*, *J Appl Bacteriol* 72 [3], Seite 262-5.
- Schmausser, B.; Andrulis, M.; Endrich, S.; Lee, S. K.; Josenhans, C.; Muller-Hermelink, H. K. und Eck, M. (2004): Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection, *Clin Exp Immunol* 136 [3], Seite 521-6.
- Schmiel, D. H. und Miller, V. L. (1999): Bacterial phospholipases and pathogenesis, *Microbes Infect* 1 [13], Seite 1103-12.



- Segal, G.; Feldman, M. und Zusman, T. (2005): The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*, FEMS Microbiol Rev 29 [1], Seite 65-81.
- Segal, G.; Russo, J. J. und Shuman, H. A. (1999): Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*, Mol Microbiol 34 [4], Seite 799-809.
- Segal, G. und Shuman, H. A. (1999): *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages, Infect Immun 67 [5], Seite 2117-24.
- Sexton, J. A. und Vogel, J. P. (2002): Type IVB secretion by intracellular pathogens, Traffic 3 [3], Seite 178-85.
- Shevchuk, Olga (2008): *D. discoideum* as a model for host-pathogen interaction: Phagosomal proteome of *Legionella*-infected cells, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Shohdy, N.; Efe, J. A.; Emr, S. D. und Shuman, H. A. (2005): Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking, Proc Natl Acad Sci U S A 102 [13], Seite 4866-71.
- Shrivastava, S. und Mande, S. S. (2008): Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes, PLoS One 3 [8], Seite e2955.
- Siegele, D. A.; Hu, J. C.; Walter, W. A. und Gross, C. A. (1989): Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, J Mol Biol 206 [4], Seite 591-603.
- Sitkiewicz, I.; Stockbauer, K. E. und Musser, J. M. (2007): Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis, Trends Microbiol 15 [2], Seite 63-9.
- Smith, G. A.; Marquis, H.; Jones, S.; Johnston, N. C.; Portnoy, D. A. und Goldfine, H. (1995): The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread, Infect Immun 63 [11], Seite 4231-7.
- Snijder, H. J. und Dijkstra, B. W. (2000): Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase, Biochim Biophys Acta 1488 [1-2], Seite 91-101.
- Soderberg, M. A.; Rossier, O. und Cianciotto, N. P. (2004): The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures, J Bacteriol 186 [12], Seite 3712-20.

- Steinert, M.; Emody, L.; Amann, R. und Hacker, J. (1997): Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, Appl Environ Microbiol 63 [5], Seite 2047-53.
- Stevens, D. L.; Troyer, B. E.; Merrick, D. T.; Mitten, J. E. und Olson, R. D. (1988): Lethal effects and cardiovascular effects of purified alpha- and theta-toxins from *Clostridium perfringens*, J Infect Dis 157 [2], Seite 272-9.
- Stevens, D. L.; Tweten, R. K.; Awad, M. M.; Rood, J. I. und Bryant, A. E. (1997): Clostridial gas gangrene: evidence that alpha and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis, J Infect Dis 176 [1], Seite 189-95.
- Stone, B. J. und Abu Kwaik, Y. (1998): Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells, Infect Immun 66 [4], Seite 1768-75.
- Sturgill-Koszycki, S. und Swanson, M. S. (2000): *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles, J Exp Med 192 [9], Seite 1261-72.
- Swanson, M. S. und Hammer, B. K. (2000): *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages, Annu Rev Microbiol 54, Seite 567-613.
- Szeto, L. und Shuman, H. A. (1990): The *Legionella pneumophila* major secretory protein, a protease, is not required for intracellular growth or cell killing, Infect Immun 58 [8], Seite 2585-92.
- Tilney, L. G.; Harb, O. S.; Connelly, P. S.; Robinson, C. G. und Roy, C. R. (2001): How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane, J Cell Sci 114 [Pt 24], Seite 4637-50.
- Titball, R. W. (2005): Gas gangrene: an open and closed case, Microbiology 151 [Pt 9], Seite 2821-8.
- Twisk-Meijssen, M. J.; Meenhorst, P. L.; van Cronenburg, B. J.; Mulder, J. D.; Scheffer, E. und van Furth, R. (1987): The course of *Legionella pneumonia* in guinea pigs after inhalation of various quantities of *L. pneumophila*, Immunobiology 176 [1-2], Seite 108-24.
- Upton, C. und Buckley, J. T. (1995): A new family of lipolytic enzymes?, Trends Biochem Sci 20 [5], Seite 178-9.
- Vernet, T.; Ziomek, E.; Recktenwald, A.; Schrag, J. D.; de Montigny, C.; Tessier, D. C.; Thomas, D. Y. und Cygler, M. (1993): Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis, J Biol Chem 268 [35], Seite 26212-9.

- Vincent, C. D.; Friedman, J. R.; Jeong, K. C.; Buford, E. C.; Miller, J. L. und Vogel, J. P. (2006): Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system, *Mol Microbiol* 62 [5], Seite 1278-91.
- Vinzing, M.; Eitel, J.; Lippmann, J.; Hocke, A. C.; Zahlten, J.; Slevogt, H.; N'Guessan P, D.; Gunther, S.; Schmeck, B.; Hippenstiel, S.; Flieger, A.; Suttorp, N. und Opitz, B. (2008): NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells, *J Immunol* 180 [10], Seite 6808-15.
- Voskuil, M. I.; Voepel, K. und Chambliss, G. H. (1995): The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 17 [2], Seite 271-9.
- Wagner, C.; Khan, A. S.; Kamphausen, T.; Schmausser, B.; Unal, C.; Lorenz, U.; Fischer, G.; Hacker, J. und Steinert, M. (2007): Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix, *Cell Microbiol* 9 [2], Seite 450-62.
- Waldburger, C.; Gardella, T.; Wong, R. und Susskind, M. M. (1990): Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma 70 affecting promoter recognition, *J Mol Biol* 215 [2], Seite 267-76.
- Weber, S. S.; Ragaz, C.; Reus, K.; Nyfeler, Y. und Hilbi, H. (2006): *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole, *PLoS Pathog* 2 [5], Seite e46.
- Weeratna, R.; Stamler, D. A.; Edelstein, P. H.; Ripley, M.; Marrie, T.; Hoskin, D. und Hoffman, P. S. (1994): Human and guinea pig immune responses to *Legionella pneumophila* protein antigens OmpS and Hsp60, *Infect Immun* 62 [8], Seite 3454-62.
- Welsch, U. (2003): Lehrbuch Histologie, Urban & Fischer Verlag, München.
- Weltzien, H. U. (1979): Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine, *Biochim Biophys Acta* 559 [2-3], Seite 259-87.
- Weyrauch, K. D. und Smollich, A. (1998): Histologie-Kurs für Verinärmediziner, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Whitsett, J. A. (2005): Surfactant proteins in innate host defense of the lung, *Biol Neonate* 88 [3], Seite 175-80.
- Wintermeyer, E.; Ludwig, B.; Steinert, M.; Schmidt, B.; Fischer, G. und Hacker, J. (1995): Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells, *Infect Immun* 63 [12], Seite 4576-83.
- Wosten, M. M. (1998): Eubacterial sigma-factors, *FEMS Microbiol Rev* 22 [3], Seite 127-50.

- Young, G. M.; Schmiel, D. H. und Miller, V. L. (1999): A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [11], Seite 6456-61.



```

LpC_mip      AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTA 369
LpP_mip      AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTA 369
LpL_mip      AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTA 369
LpPhil_mip   AATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTAACTGAAAACAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTA 375
Lhack_mip    AACAAAGCTAAGGCGATGCCTTTTAAATCAAAATAAAGCTAAAGATGGCGTAGTGAGT 414
LLAP10_mip   AACAAAGACAAAAGGTGAAGCGTTTTTAAAGAAAATAAAGCTAAGCCTGGAATTGTTTCA 369
              ** **      ** ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

LpC_mip      TTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCGGTAAA 429
LpP_mip      TTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCGGTAAA 429
LpL_mip      TTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCGGTAAA 429
LpPhil_mip   TTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAGTAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCGGTAAA 435
Lhack_mip    TTACCAAGTGGTTTGCAATACAAATTTTGCAAAAGGGTGACGGCGCTAAACCTTCTAAA 474
LLAP10_mip   TTACCAAGCGGATTGCAATATAAAATCATTGAAAGTGGCAATGGTCTTAACCCAGGTAAA 429
              ** ***** ** ***** ** * * * ** * ** ***** **

LpC_mip      TCGGATACAGTCACTGTGCAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGT 489
LpP_mip      TCGGATACAGTCACTGTGCAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGT 489
LpL_mip      TCCGATACAGTCACTGTGCAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGT 489
LpPhil_mip   TCGGATACAGTCACTGTGCAATATACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTGACAGT 495
Lhack_mip    GATGATACTGTTACCGTTGAATACACTGGTACATTAATTGATGGTCAGGTTTTTGATAGT 534
LLAP10_mip   ACAGATACTGTAACGTGTTGAATATACTGGTCGTCTGATCGATTGATGATGATGATGATG 489
              ***** ** ** ** ***** ***** * ** ***** ** ** ** ** **

LpC_mip      ACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATCCCGAGGATGGACA 549
LpP_mip      ACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTATCCCTGGATGGACA 549
LpL_mip      ACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACTTTTCAGGTTTCACAAGTTATCCCGAGGATGGACT 549
LpPhil_mip   ACCGAAAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTATCCCTGGATGGACA 555
Lhack_mip    ACTGACCGAACTGGCAAGCCAGCTACGTTCAAAGTATCACAAGTTATCCCTGGCTGGACT 594
LLAP10_mip   ACAGAAAAGACTGGTAAACCAGCAACGTTCCAAGTATCACAAGTAATTCCTGGCTGGACT 549
              ** **      ***** ** ***** ** * * * ***** ** ** ** *****

LpC_mip      GAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCCCTCAGGTCTT 609
LpP_mip      GAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCCCTCAGGTCTT 609
LpL_mip      GAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACCTGGGAAATTTATGTTCCATCAGGTCTT 609
LpPhil_mip   GAAGCTTTGCAATTGATGCCAGCTGGATCAACTTGGGAAATTTATGTTCCCTCAGGTCTT 615
Lhack_mip    GAAGCACTACAATTGATGCCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTTTATGTTCCCTGCTGATTTA 654
LLAP10_mip   GAAGCATTACAATTAATGCCTGCTGGCTCTACTTGGGAAATCTATGTTCCATCAGGTCTT 609
              ***** * ***** ***** ***** ** ** ***** * ***** ** * * *

LpC_mip      GCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATGAAACTTTAATATTAAAA 669
LpP_mip      GCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATGAAACTTTAATATTAAAA 669
LpL_mip      GCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATGAAACTTTAATATTAAAA 669
LpPhil_mip   GCATATGGCCCACGTAGCGTTGGCGGACCTATTGGCCCAAATGAAACTTTAATATTAAAA 675
Lhack_mip    GCCTATGGTCCTCGCAGTGTGGTGGCCCAATTGGTCCAAATGAGACTTTAATTTTCAAA 714
LLAP10_mip   GCTTATGGCCCACGTAGTGTGGTGGCCCAATAGGACCAAATGAAACTTTAATTTTCAAG 669
              ** ***** ** ** ** ***** ** * * * ***** ***** ***** ** **

LpC_mip      ATTCACTTAATTTTCAGTGAAAAAATCATCT--TAA 702
LpP_mip      ATTCACTTAATTTTCAGTGAAAAAATCATCT--TAA 702
LpL_mip      ATTCACTTAATTTTCAGTGAAAAAATCATCT--TAA 702
LpPhil_mip   ATTCACTTAATTTTCAGTGAAAAAATCATCT--TAA 708
Lhack_mip    ATTCATTTAATCTCTGTAAAAAATCTGACGCTTAA 750
LLAP10_mip   ATTCATTTGATTTCTGTGAAAAAAGCTTCTGCCTAA 705
              ***** ** ** ** ***** * *****

```



Sequenzvergleich verschiedenener *plaB*-Gene

LpC_ <i>plaB</i>	-----ATGATTGTTATCTTCGTCATGGC	24
LpP_ <i>plaB</i>	-----ATGATTGTTATCTTCGTCATGGC	24
LpL_ <i>plaB</i>	-----ATGATTGTTATCTTCGTCATGGC	24
LpPhil_ <i>plaB</i>	-----ATGATTGTTATCTTCGTCATGGC	24
Lhack_ <i>plaB</i>	-----ATGATTGTTATCTTCGTCATGGC	24
LLAP10_ <i>plaB</i>	ATGCCTCCTTGTGGTGTCAATAATTTAAGGAAAGTTATGATTGTTATCTTCGTTTCATGGT	60
	*****	
LpC_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATACTTATGGGGAACCTCCTCAATGGCTTGAAAATCAGAGC	84
LpP_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATACTTATGGGGAACCTCCTCAATGGCTTGAAAATCAGAGC	84
LpL_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATACTTATGGGGAACCTCCTCAATGGCTTGAAAATCAGAGT	84
LpPhil_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATACTTATGGGGAACCTCCTCAATGGCTTGAAAATCAGAGT	84
Lhack_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATACTTATGGGGAACCTCCTCAATGGCTTGAAAATCAGAGT	84
LLAP10_ <i>plaB</i>	TGGAGTGTACGCATACCAATGCTTATGGAGAGCTTCCTCAATGGCTTGAAAGTCAGAGC	120
	*****	
LpC_ <i>plaB</i>	AAACAGGGAAAGCTGGATATTCAAGTCGGCAATATTTATCTTGGGCGCTACATCAGTTTT	144
LpP_ <i>plaB</i>	AAACAGGGAAAGCTGGATATTCAAGTCGGCAATATTTATCTTGGGCGCTACATCAGTTTT	144
LpL_ <i>plaB</i>	AAACAGGGAAAGCTGGATATTCAAGTCGGCAATATTTATCTTGGGCGCTATATTAGTTTT	144
LpPhil_ <i>plaB</i>	AAACAGGGAAAGCTGGATATTCAAGTCGGCAATATTTATCTTGGGCGCTATATTAGTTTT	144
Lhack_ <i>plaB</i>	CAGGACGGAAAGTTGGATATTCAAGTTGGTAATATCTACCTCGGGCACTATATCAGCTTT	144
LLAP10_ <i>plaB</i>	AAAGACGGAAAGCTGAACATTCAAGTTGGTAATATCTATCTAGGGCACTATATAAGCTTT	180
	* * * * *	
LpC_ <i>plaB</i>	GATGATACGGTGACGGTTGACGATATAGCACGCGCATTGATCAAGCGGTACGTGATGAA	204
LpP_ <i>plaB</i>	GATGATACGGTGACGGTTGACGATATAGCACGCGCATTGATCAAGCGGTACGTGATGAA	204
LpL_ <i>plaB</i>	GATGATACGGTGACGATTGACGATATAGCACGCGCATTGATCAAGCGGTACGTGATGAA	204
LpPhil_ <i>plaB</i>	GATGATACGGTGACGGTTGACGATATAGCACGCGCATTGATCAAGCGGTACGTGATGAA	204
Lhack_ <i>plaB</i>	GACGATACGTAACCGTCGACGATATAGCGCGTCATTAAATCAGGCTGTGCGTGATGAA	204
LLAP10_ <i>plaB</i>	GACGATACGTAACAGTCGATGATATTGCACGTGCATTGATCATGTCAGTCGTGATGAA	240
	** * * * *	
LpC_ <i>plaB</i>	ATTGCTGATAAGCTACGAGATGGGCAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCTACCGGTGGG	264
LpP_ <i>plaB</i>	ATTGCTGATAAGCTACGAGATGGGCAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCTACCGGTGGG	264
LpL_ <i>plaB</i>	ATTGCTGATAAAGTAAAGATGGGCAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCTACTGGTGGG	264
LpPhil_ <i>plaB</i>	ATTGCTGATAAAGTAAAGATGGGCAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCTACTGGTGGG	264
Lhack_ <i>plaB</i>	ATTGCGGATAAGCTAGGCAAGGAGAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCTGCGGTGGC	264
LLAP10_ <i>plaB</i>	ATTGCTGATAAGCTGCAAGATGGGAGCGTTTTGCTTGTATCACTCACTCAACCGGTGGC	300
	*****	
LpC_ <i>plaB</i>	CCCATTGTCCGCAAAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTG	324
LpP_ <i>plaB</i>	CCCATTGTCCGCAAAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTA	324
LpL_ <i>plaB</i>	CCCATTGTCCGCAAAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTG	324
LpPhil_ <i>plaB</i>	CCATTGTCCGCAAAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTG	324
Lhack_ <i>plaB</i>	CCATTGTTCGTAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTG	324
LLAP10_ <i>plaB</i>	CCCGTAGTTTCGTAATGGATGGATTTATACTTTAAGAATAATCTTGCAAAATGTCGGTTA	360
	** * * * *	
LpC_ <i>plaB</i>	AGTCACCTTATCATGCTGGCTCCTGCCAACCACGGTTCTGCTCTTGCTCAGCTTGGCAAA	384
LpP_ <i>plaB</i>	AGTCACCTTATCATGCTGGCTCCTGCCAACCACGGTTCTGCTCTTGCTCAGCTTGGCAAA	384
LpL_ <i>plaB</i>	AGTCACCTTATCATGCTGGCTCCTGCCAACCACGGTTCTGCTCTTGCTCAACTTGGTAAA	384
LpPhil_ <i>plaB</i>	AGTCACCTTATCATGCTGGCTCCTGCCAACCACGGTTCTGCTCTTGCTCAACTTGGTAAA	384
Lhack_ <i>plaB</i>	AGTCATCTTATTATGCTGGCTCCTGCCAATCATGGGTCTGCGCTTGCTCAATTAGGTAAA	384
LLAP10_ <i>plaB</i>	AGCCATCTTATCATGCTGGCTCCTGCCAACCACGGTTCTGCGCTTGCTCAACTGGGTAAA	420
	** * * * *	
LpC_ <i>plaB</i>	TCCCGCCTAGGCCGCATAAAGAGTTTTTTTGAAGGCATTGAACCGGGAAAGTGTGTACTT	444
LpP_ <i>plaB</i>	TCCCGCCTAGGCCGCATAAAGAGTTTTTTTGAAGGCATTGAACCGGGAAAGTGTGTACTT	444
LpL_ <i>plaB</i>	TCCCGCCTAGGCCGCATAAAGAGTTTTTTTGAAGGCATTGAACCGGGAAAGTGTGTACTT	444
LpPhil_ <i>plaB</i>	TCCCGCCTAGGCCGCATAAAGAGTTTTTTTGAAGGCATTGAACCGGGAAAGTGTGTACTT	444
Lhack_ <i>plaB</i>	TCTCGATTAGGTCGTATAAAGGCTTCTTTGAAGGTATCGAACCAGGCGAGCATGTACTT	444
LLAP10_ <i>plaB</i>	TCCCGGTTAGGCCGTATAAAGGTTTTTTTGAAGGTATTGAACCGGGACAACCGTACTT	480
	** * * * *	
LpC_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAGCTCGGAAGCGATATGAGCTGGCAACTTAATGAAAGCTGGCTTGATTAT	504
LpP_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAGCTCGGAAGCGATAAGAGCTGGCAACTTAATGAAAGCTGGCTTGATTAT	504
LpL_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAACCTCGGAAGCGATATGAGCTGGCAACTTAATGAAAGCTGGCTTGATTAT	504
LpPhil_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAACCTCGGAAGCGATATGAGCTGGCAACTTAATGAAAGCTGGCTTGATTAT	504
Lhack_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAGCTTGGGAAGCGATAAGAGCTGGGAACCTTAATGAAAGTTGGCTTGATTAT	504
LLAP10_ <i>plaB</i>	GATTGGCTTGAACCTCGGAAGCGATATGAGCTGGCAGCTTAATGAAATTTGGCTTGATTAC	540
	*****	



LpC_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	564
LpP_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	564
LpL_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	564
LpPhil_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	564
Lhack_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	564
LLAP10_plaB	GATTGCACTGCCAATGGTGTCTATTCTTTGTACTTACTGGCCAGAAAATTGATCGCCAA	600
*****		
LpC_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	624
LpP_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	624
LpL_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	624
LpPhil_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	624
Lhack_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	624
LLAP10_plaB	TTTTATGATGCAGTAAACTCCTACACAGGAGAATCTGGATCCGATGGGGTGGTACGCGTT	660
*****		
LpC_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	684
LpP_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	684
LpL_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	684
LpPhil_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	684
Lhack_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	684
LLAP10_plaB	GCTGCAACAAATATGAATTATAGCTTATTGAAATTACATCAGGAGGGGGATAACGGTGAA	720
*****		
LpC_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	744
LpP_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	744
LpL_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	744
LpPhil_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	744
Lhack_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	744
LLAP10_plaB	AGTCTTGTGTGCGCCAAAATGACACGAACACAGCCAATGGCATTGGAGTTCTACCTGGA	780
*****		
LpC_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	804
LpP_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	804
LpL_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	804
LpPhil_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	804
Lhack_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	804
LLAP10_plaB	CTTTCACATTCCGGTAAAAATATCGGTATCATCCGTAGTATTACTATGGCCAATGCAGCC	840
*****		
LpC_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	864
LpP_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	864
LpL_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	864
LpPhil_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	864
Lhack_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	864
LLAP10_plaB	ACTCACCCACGGCGATATGGATCCTGCGATGCCTGCAAGTAAAAAGTCGTGACTCCTAT	900
*****		
LpC_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	924
LpP_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	924
LpL_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	924
LpPhil_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	924
Lhack_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	924
LLAP10_plaB	AATAAATTAGTAAAAGAGTTAGACAATATTACTAAAGAGACTCAGAAAAATGAGCATAAG	960
*****		
LpC_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	984
LpP_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	984
LpL_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	984
LpPhil_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	984
Lhack_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	984
LLAP10_plaB	GAATTTGTGAAAACACTTGTCTTTACGCGCGAGTATATAACCAATCGTTACTCTATGATT	1020
*****		
LpC_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1044
LpP_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1044
LpL_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1044
LpPhil_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1044
Lhack_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1044
LLAP10_plaB	ATTTTCCGGCTTATTGATGACCGCGGCAATCACCTTATCGATTATGATCTTTACCTAACT	1080
*****		

LpC_plaB	GCCGGACCTCAATATAGCGAGCAGGCGCTTCCTGCAGGTTTTTTTGTAGATCGTCAGCGA	1104
LpP_plaB	GCCGGACCTCAATATAGCGAGCAGGCGCTTCCTGCAGGTTTTTTTGTAGATCGTCAGCGA	1104
LpL_plaB	GCCGGACCTCAATATAGCGAGCAGGCGCTTCCTGCAGGTTTTTTTGTAGATCGTCAGCGA	1104
LpPhil_plaB	GCCGGACCTCAATATAGCGAGCAGGCGCTTCCTGCAGGTTTTTTTGTAGATCGTCAGCGA	1104
Lhack_plaB	GCCGGTCCGAAATTTAGCGAGCAGGCCCTTCCACGGGTTTCTTCGGAGATCGCCAGCGA	1104
LLAP10_plaB	GCTGGCCCCAAATATAGCGAGGACGCGCTTCCTGCAGGTTTCTTCGTAGACCGCCAGAAA	1140
	** ** *	
LpC_plaB	AATCTCAATAATCGAGGTAAACTGACTTATTTTCTTGACTACGATATTATGGAAGGTGGA	1164
LpP_plaB	AATCTCAATAATCGAGGTAAACTGACTTATTTTCTTGACTACGATATTATGGAAGGTGGA	1164
LpL_plaB	AATCTCAATAATCGAGGTAAACTGACTTATTTTCTTGACTACGATATCATGGAAGGTGGA	1164
LpPhil_plaB	AATCTCAATAATCGAGGTAAACTGACTTATTTTCTTGACTACGATATCATGGAAGGTGGA	1164
Lhack_plaB	AACCAGCATAATCGAGGAAAAGTACTTATTTCTTGACTACGATATCATGGAAGCAGGA	1164
LLAP10_plaB	AACCAGCAGCTCGAGGAAAAGTACTTATTTCTTGACTACGATATCATGGAAGCCGGA	1200
	** *	
LpC_plaB	ATTAATACCCCAAAAATGCGAGGTAACTTGGGTTTCGTGTTAAAGCATATCCTGAATCA	1224
LpP_plaB	ATTAATACCCCAAAAATGCGAGGTAACTTGGGTTTCGTGTTAAAGCATATCCTGAATCA	1224
LpL_plaB	ATTAATACCCCAAAAATGCGAGGTAACTTGGGTTTCGTGTTAAAGCATATCCTGAATCA	1224
LpPhil_plaB	ATTAATACCCCAAAAATGCGAGGTAACTTGGGTTTCGTGTTAAAGCATATCCTGAATCA	1224
Lhack_plaB	ATAAATACGCCCAAAAATGCAAGGTAAATTTGGGATTTTCGTATTAAAGCGCGTCCCGAAGCG	1224
LLAP10_plaB	ATTAATACGCCCAAAAATGCAAGGTAACTTAGGGTTTCGTATTAAAGGCACAACCTGAAGCA	1260
	** *	
LpC_plaB	AGTGACCAAGCCCTTGCTATTACAGGTTACTTGATTTTCATTTCATCGCTTGCTGACATT	1284
LpP_plaB	AGTGACCAAGCCCTTGCTATTACAGGTTACTTGATTTTCATTTCATCGCTTGCTGACATT	1284
LpL_plaB	AGTGAGCAAGCCCTTGCTATTACAGGTTACTTGATTTTCATTTCATCGCTTGCTGACATT	1284
LpPhil_plaB	AGTGAGCAAGCCCTTGCTATTACAGGTTACTTGATTTTCATTTCATCGCTTGCTGACATT	1284
Lhack_plaB	AGTGACCAAGCTCTTGCTTATTACCGATTACTTGATTTTCATTTCCTCCCTGGCTGACATT	1284
LLAP10_plaB	AGCGACCAAGCCCTTGCTTACTACAGGTTACTTGATTTTCATTTCACGCTCGCTGACATT	1320
	** ** *	
LpC_plaB	CACAAAATACTTCATCCGAATGAAACCGTAATGGTTGAAATCATGCTTCAAAGACGAGTA	1344
LpP_plaB	CACAAAATACTTCATCCGAATGAAACCGTAATGGTTGAAATCATGCTTCAAAGACGAGTA	1344
LpL_plaB	CACAAAATACTTCATCCGAATGAAACCGTAATGATTGAAATCATGCTGCAAAGACGAGTA	1344
LpPhil_plaB	CACAAAATACTTCATCCGAATGAAACCGTAATGGTTGAAATCATGCTGCAAAGACGAGTA	1344
Lhack_plaB	AATAAAATTTCTTCATCCGAATGAAACCGTTATGGTTGAAATCATGCTTCAGCGACGAGTA	1344
LLAP10_plaB	AACAAAATTTCTTCATCCGAATGAAACAGTAATGGTCGAAATCATGCTTCAGCGACGAGTA	1380
	* *	
LpC_plaB	GATAGGACAGTTTTCCGTATCAGCAACAACCTTACTCCGGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1404
LpP_plaB	GATAGGACAGTTTTCCGTATCAGCAACAACCTTACTCCGGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1404
LpL_plaB	GATAGGACAGTTTTCCGCATCAACAACAACCTTACTCCGGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1404
LpPhil_plaB	GATAAGACAGTTTTCCGTATCAACAACAACCTTACTCCGGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1404
Lhack_plaB	GATAGGACGGTCACCCGTATAACCAATAACCTTACTCCGGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1404
LLAP10_plaB	GATAGAACTGTCTCCCGTATCACAACAACCTTACTCCAGCAAAAATCAGTGGAAGCCA	1440
	**** *	
LpC_plaB	ACTGGCAAAAAGATAGATTGA	1425
LpP_plaB	ACTGGCAAAAAGATAGATTGA	1425
LpL_plaB	ACTGGGAAAAAGATAGATTGA	1425
LpPhil_plaB	ACTGGGAAAAAGATAGATTGA	1425
Lhack_plaB	AGTGGCATAAAAGTAGATTAA	1425
LLAP10_plaB	ACAGGCAAAAAGGTAGATTAA	1461
	* *	

## Sequenzvergleich verschiedener PlaB-Proteine

Neben dem Sequenzvergleich sind hier die von Bender et al. identifizierten katalytisch wichtigen Aminosäuren vermerkt (Bender et al., 2009). Die katalytische Triade Ser-85/Asp-203/His-251 (rot) ist in eine konservierte, bisher noch nicht beschriebene Konsensussequenz eingebettet (orange). Weitere Aminosäuren sind wichtig für die hydrolytische Aktivität von PlaB (blau) (Bender et al., 2009). Weiterhin ist eine über das COILS 2.2 Programm ermittelte, mögliche coiled-coil Region eingezeichnet (grün) (Lupas, 1996; Lupas et al., 1991; Parry, 1982).

LpC_PlaB	-----MIVIFV <b>HG</b> SVTHTNTY <b>EL</b> PQWLENQSKQ <b>GL</b> DIQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
LpP_PlaB	-----MIVIFV <b>HG</b> SVTHTNTY <b>EL</b> PQWLENQSKQ <b>GL</b> DIQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
LpL_PlaB	-----MIVIFV <b>HG</b> SVTHTNTY <b>EL</b> PQWLENQSKQ <b>GL</b> DIQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
LpPhil_PlaB	-----MIVIFV <b>HG</b> SVTHTNTY <b>EL</b> PQWLENQSKQ <b>GL</b> DIQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
Lhack_PlaB	-----MIVIFV <b>HG</b> SVTHTNTY <b>EL</b> PQWLENQSKQ <b>GL</b> DIQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
LLAP10_PlaB	MPPCGVNNLRKVMIVFV <b>HG</b> SVTHTNAYG <b>EL</b> PQWLESQSKDGKLN <b>IQ</b> VGN <b>IL</b> GHYISF	60
Lspirit_PlaB	-----MIVIFL <b>HG</b> SVTHTNTY <b>AL</b> PLWLES <b>LG</b> KDGK <b>LD</b> IQVGN <b>IL</b> GRYISF	48
	*****:*****:*** ** * . . .:*****:*****	
LpC_PlaB	DDTVTVDDIARAFDQAVRDEIADKL <b>RD</b> GQRFACI <b>THSTGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFKNNLAKCPL	108
LpP_PlaB	DDTVTVDDIARAFDQAVRDEIADKL <b>RD</b> GQRFACI <b>THSTGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFKNNLAKCPL	108
LpL_PlaB	DDTVTVDDIARAFDQAVRDEIADKL <b>RD</b> GQRFACI <b>THSTGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFKNNLAKCPL	108
LpPhil_PlaB	DDTVTVDDIARAFDQAVRDEIAAKV <b>KD</b> GQRFACI <b>THSTGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFKNNLAKCPL	108
Lhack_PlaB	DDTVTVDDIARAFNQA <b>VR</b> DEIADKL <b>GK</b> GERFACI <b>THSAGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFKDNLAKCPL	108
LLAP10_PlaB	DDTVTVDDIARAFDHAVRDEIADKLQDGERFACI <b>THSTGG</b> PVVRK <b>MD</b> LYFKNNLAKCPL	120
Lspirit_PlaB	DDTVMVDDIARAFDHAVRDDIADKLQDGERFACI <b>THSTGG</b> PIVRK <b>MD</b> LYFGNNLAKCPL	108
	****:*****:*****:*** *: *:*****:*****:*****	
LpC_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGKCVLDWLE <b>LG</b> SDMSWQ <b>LN</b> ESWLDY	168
LpP_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGKCVLDWLE <b>LG</b> SDKSWQ <b>LN</b> ESWLDY	168
LpL_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGKCVLDWLE <b>LG</b> SDMSWQ <b>LN</b> ESWLDY	168
LpPhil_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGKCVLDWLE <b>LG</b> SDMSWQ <b>LN</b> ESWLDY	168
Lhack_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGHVL <b>DW</b> LE <b>LG</b> SDKSW <b>EL</b> NESWLDY	168
LLAP10_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGIEPGQHVL <b>DW</b> LE <b>LG</b> SDMSWQ <b>LN</b> ENWLDY	180
Lspirit_PlaB	SHLIMLAPANHGSALAQLG <b>KS</b> RLGRIKSFFEGVEPGHVL <b>DW</b> LE <b>LG</b> SDMSWQ <b>LN</b> ESWLDY	168
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
LpC_PlaB	DCTANGVYSFVL <b>TG</b> QKIDRQFYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>SGSDGVV</b> RVAATNMNYSLLKL <b>HQ</b> EGDN <b>GE</b>	228
LpP_PlaB	DCTANGVYSFVL <b>TG</b> QKIDRQFYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>SGSDGVV</b> RVAATNMNYSLLKL <b>HQ</b> EGDN <b>GE</b>	228
LpL_PlaB	DCTANGVYSFVL <b>TG</b> QKIDRQLYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>SGSDGVV</b> RVAATNMNYSLLKL <b>HQ</b> EGDN <b>GE</b>	228
LpPhil_PlaB	DCTANGVYSFVL <b>TG</b> QKIDRQLYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>SGSDGVV</b> RVAATNMNYSLLKL <b>HQ</b> EGDN <b>GE</b>	228
Lhack_PlaB	DCTANGIYSFVL <b>TG</b> QKIDRQLYDALNSY <b>TG</b> EG <b>AGSDGVV</b> RVAANMNYSLLKL <b>HQ</b> EGSN <b>GE</b>	228
LLAP10_PlaB	DCTANGIYSFVL <b>TG</b> QKIDRQLYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>VGSDGVV</b> RVAANMNYSLLKL <b>HQ</b> EGSN <b>GE</b>	240
Lspirit_PlaB	DCPANGIYTFVL <b>TG</b> QKIDRQLYDAVNSY <b>TG</b> EG <b>AGSDGVV</b> RVAANMNYSLLKL <b>HQ</b> EGTN <b>GD</b>	228
	**:*:*:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
LpC_PlaB	SLVVAKMTRTQPMAFGVL <b>PGL</b> <b>SHS</b> GKNIGIIRSITMANAAT <b>HT</b> AIWILRCLQVKS <b>RD</b> SY	288
LpP_PlaB	SLVVAKMTRTQPMAFGVL <b>PGL</b> <b>SHS</b> GKNIGIIRSITMANAAN <b>HT</b> AIWILRCLQVKS <b>RD</b> SY	288
LpL_PlaB	SLVVAKMTRTQPMAFGVL <b>PGL</b> <b>SHS</b> GKNIGIIRSITMANAAT <b>HT</b> AIWVLRCLQVKS <b>RD</b> SY	288
LpPhil_PlaB	SLVVAKMTRTQPMAFGVL <b>PGL</b> <b>SHS</b> GKNIGIIRSITMANAAT <b>HT</b> AIWVLRCLQVKS <b>RD</b> SY	288
Lhack_PlaB	NLIVAKMTRTQPMAFGVL <b>PGC</b> <b>AHS</b> GKKMGIIRSITLANAAT <b>HT</b> AIWILKCLKV <b>KTR</b> DSY	288
LLAP10_PlaB	NLVVAKMIRTPMAFGVL <b>PGC</b> <b>AHS</b> GKKMGIIRSVTMANAAT <b>HT</b> AIWVLRCLQVRN <b>RD</b> SY	300
Lspirit_PlaB	SLVVAKMKRAQPTAFGVL <b>PGL</b> <b>SHS</b> GKNIGIIRSVTMANAAT <b>HT</b> AIWVLRCLQVKN <b>RD</b> AY	288
	.*:*****:*** ** * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
LpC_PlaB	<b>NKL</b> V <b>KEL</b> D <b>NI</b> T <b>KE</b> TQKNEHKEFVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
LpP_PlaB	<b>NKL</b> V <b>KEL</b> D <b>NI</b> T <b>KE</b> TQKNEHKEFVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
LpL_PlaB	<b>NKL</b> V <b>KEL</b> D <b>NI</b> T <b>KE</b> TQKNEHKEFVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
LpPhil_PlaB	<b>NKL</b> V <b>KEL</b> D <b>NI</b> T <b>KE</b> TQKNEHKEFVKTLVFTREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
Lhack_PlaB	<b>DTL</b> T <b>KEL</b> D <b>KL</b> T <b>Q</b> E <b>T</b> QKNEHIEFVNTLLYKREYITNRYTMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
LLAP10_PlaB	<b>NTL</b> A <b>KEL</b> D <b>K</b> I <b>T</b> K <b>E</b> TQKNEHAELVKTLIYKREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	360
Lspirit_PlaB	<b>NTL</b> A <b>KEL</b> D <b>K</b> I <b>T</b> K <b>E</b> TQKNEHTESVKTLIYKREYITNRYSMIIFRLIDDRGNH <b>LD</b> YD <b>LY</b> LT	348
	:*:*:*:*:*:*****:*** ** * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

```

LpC_PlaB      AGPQYSEQALPAGFFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEGGINTPKMQGNLGFRVKAYPES 408
LpP_PlaB      AGPQYSEQALPAGFFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEGGINTPKMQGNLGFRVKAYPES 408
LpL_PlaB      AGPQYSEQALPAGFFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEGGINTPKMQGNLGFRVKAYPES 408
LpPhil_PlaB   AGPQYSEQALPAGFFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEGGINTPKMQGNLGFRVKAYPES 408
Lhack_PlaB    AGPKFSEHALPTGFFGDRQRNQHNRGKLTyYLDYDIMEAGINTPKMQGNLGFRiKARPEA 408
LLAP10_PlaB   AGPKYSEDALPAGFFVDRQKNQHARGKLTyFLDYDIMEAGINTPKMQGNLGFRiKAQPEA 420
Lspirit_PlaB  AGPEYSEALPAGFFVDRQRNLNNRGKLTyFLDYDIMEAGINTPKMQGNLGFRiKAYPQS 408
               ***:.*.***.***  ***.* :  *****.*****.*****.*****.*** *:
               .

LpC_PlaB      SDQALAYYRLLDHFHSSLADIHKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISNNLTPAKISGKP 468
LpP_PlaB      SDQALAYYRLLDHFHSSLADIHKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISNNLTPAKISGKP 468
LpL_PlaB      SEQALAYYRLLDHFHSSLADIHKILHPNETVMIEIMLQRRVDRTVFRINNNLTPAKISGKP 468
LpPhil_PlaB   SEQALAYYRLLDHFHSSLADIHKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRINNNLTPAKISGKP 468
Lhack_PlaB    SDQALAYYRLLDHFHSSLADINKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVTRITNNLTPAKISVKP 468
LLAP10_PlaB   SDQALAYYRLVLDHFSTLADINKILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVSRITNNLTPAKISGKP 480
Lspirit_PlaB  SQGALAYYRLLDHFHSSLADINKILHPNETVMIEIMLQRRVDRTVSRITNNLTPAKISVKP 468
               *  *****.*****.***.*****.*****.*****.*** **.****** **
               .

LpC_PlaB      TGKKID 474
LpP_PlaB      TGKKID 474
LpL_PlaB      TGKKID 474
LpPhil_PlaB   TGKKID 474
Lhack_PlaB    SGIKVD 474
LLAP10_PlaB   TGKKVD 486
Lspirit_PlaB  TGKTVd 474
               :* .:*

```

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\alpha$	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
ad	auffüllen auf
AFLP	<u>a</u> mpified <u>f</u> ragment <u>l</u> ength polymorphism
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-Persulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBP	Calmodulinbindeprotein
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
Cm	Chloramphenicol
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CsrA	carbon storage regulator A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>dot/ icm</i>	defect in organelle trafficking/ intracellular replication
DPPC	1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera, und Andere
ETOH	Ethanol
F	Farad
Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub>	Eisen(III)-pyrophosphat
Fe <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Eisen(III)-nitrat
FFA	freie Fettsäuren
g	Gramm
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GCAT	Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase
h	hour(s), Stunde(n)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Insertion sequence element
k	kilo
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria Bertani
LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole
LPLA	Lysophospholipase A
M	Molar
mA	Milliampere
MIF	mature intracellular form
min	Minute(n)
Mip	macrophage infectivity potentiator
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOMP	Major outer membrane protein
mRNA	messenger RNA
MspA	Major secretory protein A, codiert durch <i>proA</i>
n	nano
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat-5-hydrat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nm	nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PHB	Polyhydroxybutyrat
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMN	Polymorph nucleare Leukozyten
PPIase	peptidyl prolyl cis/trans isomerase
r	Resistenz

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transcription
SBT	sequence-based typing
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Sec	general secretory pathway
Sg	Serogruppe
sigma	sigma
SRP	signal recognition pathway
ssp.	Subspezies
T1SS	Typ I Sekretionssystem
T2SS	Typ II Sekretionssystem
T3SS	Typ III Sekretionssystem
T4ASS	Typ IVA Sekretionssystem
T4BSS	Typ IVB Sekretionssystem
T5SS	Typ V Sekretionssystem
T6SS	Typ VI Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	twin-arginine translocation
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tn	Transposon
Tris	Trishydroxylmethhylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ÜN-Kultur	Übernachtskultur
V	Volt
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YEB	Buffered Yeast Extract
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ω	Ohm

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg und anschließend am Robert Koch-Institut in Berlin danken.

Herrn PD. Dr. Klaus Heuner danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft, den wissenschaftlichen Freiraum und das angenehme Arbeitsklima.

Diese Arbeit entstand aus einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Kooperationsprojekt von PD Dr. Klaus Heuner und PD Dr. Antje Flieger. In diesem Zusammenhang möchte ich die sehr kollegiale und voranbringende Zusammenarbeit mit Jennifer Bender von der Arbeitsgruppe FG11 des Robert-Koch-Instituts besonders hervorheben.

Den Kollegen vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung in Würzburg danke ich für ihre große Kollegialität, die das Arbeiten sehr angenehm und den Wechsel nach Berlin umso schwerer gemacht hat.

Vielen Dank auch an Dr. med. Patrick Adam, Dr. med. Udo Lorenz und Dr. Dr. med. vet. Katharina Remer für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Meerschweinchenexperimente in Würzburg.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kollegen unserer neuen Arbeitsgruppe P26 am Robert Koch-Institut für die stete Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken: Vroni Herrmann, Monika Lautner, Kerstin Rydzewski, Tino Schulz, Yvonne Matern, Nicole Janitzek, Dr. Susanne Behrens-Kneip und allen Studenten, die schon unsere Arbeitsgruppe bereichert haben.

Mein besonderer Dank gilt besonders meinem Lebenspartner Tino Schulz und auch meinen Eltern, die mich immer bei der Verfolgung meine Ziele unterstützen und für den Ausgleich zur Arbeit sorgen



## Tagungen

### 2006

- Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 1.10.2006-4.10.2006, Würzburg, *Poster*, Titel: PlaB-a new virulence factor of *Legionella pneumophila*

### 2007

- Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 30.09.2007-03.10.2007, Göttingen, *Vortrag*: PlaB-a new virulence factor of *Legionella pneumophila*
- Workshop “Molecular Processes in health and diseases, microbiology and microbial bioinformatics”, Tel Aviv University, NoE-“EuroPathogenomics”, 25.02.2007 - 28.02.2007, Tel Aviv, Israel
- “Molecular Microbiology Young Microbiologists Minisymposium on Prokaryotic Membranes”, 12.10.2007, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
- Symposium “Infectivity and host cells” 19.11.2007-21.11.2007, Wittenberg, *Vortrag*, Titel: Phospholipases are virulence factors of *Legionella pneumophila*

### 2008

- Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 21.09.2008-24.09.2009, Dresden, *Poster*, Titel: PlaB-a new virulence factor of *Legionella pneumophila*
- Workshop “Inter-Academy Meeting Nosocomial Infections and Host susceptibility”, Deutsche Gesellschaft der Naturforscher Leopoldina, 18.09.2009-20.09.2009, Berlin

### 2009

- Mini-Symposium “Biochemistry of Host-Pathogen Interactions“, 28.01.2009-30.01.2009, Kloster Banz, *Vortrag*, Titel: The phospholipase PlaB-a new virulence factor of *Legionella pneumophila*
- Legionella 2009, 13.10.2009-17.10.2009 Institut Pasteur, Paris, Frankreich, *Poster*, Titel: Characterization of the major cell-associated phospholipase A/lysophospholipase A of *Legionella pneumophila*

## Publikationen

- Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., **Schunder, E.**, Steinert, M., Hacker, J., and Heuner, K. (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (*trb/tra*) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. Int J Med Microbiol 298, 411-428.
- Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., **Schunder, E.**, Heuner, K. and Flieger, A. (2009) Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. J Biol Chem. (in press, online ahead of print).
- **Schunder, E.**, Adam, P., Higa F., Remer K., Lorenz, U., Bender J., Schulz T., Flieger A., Steinert M., and Heuner K. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila* (in revision).

## **Erklärung**

Gemäß §7 der Promotionsordnung der Humboldt-Universität zu Berlin erkläre ich hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 2009

Eva Schunder